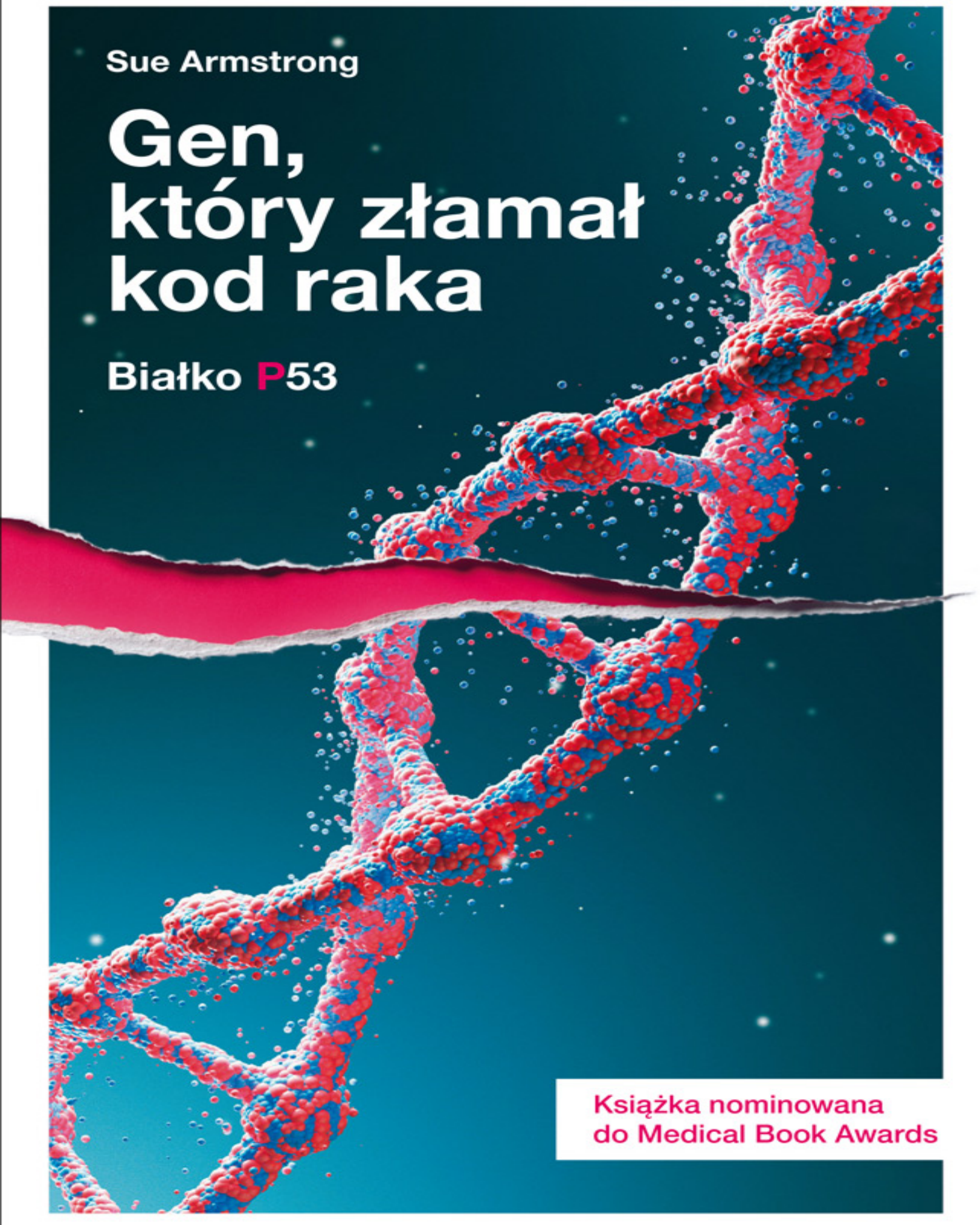
Sue Armstrong

Gen, który złamał kod raka

Białko P53



Książka nominowana do Medical Book Awards

Więcej tytułów serii

KURHAUS ZDROWIE

Śmierć raka
Vincent T. DeVita, Elizabeth DeVita-Raeburn

SYZYF 2.0

List do mojego życia
Miriam Meckel

Ścigając Steve'a Jobsa
Magda Gacyk

CYWILIZACJA

Nadchodzi osobliwość
Raymond Kurzweil

Wyścig z maszynami
Erik Brynjolfsson, Andy McAfee

Sue Armstrong

Białko p53

Gen, który złamał kod raka

Przełożył **Marcin Wąsiel**

WARSZAWA 2017

Tytuł oryginału: *P53. The Gene that cracked the Cancer Code*

Copyright @ 2014 Sue Armstrong
All rights reserved
First published in 2014. Paperback edition 2015

Wydanie polskie:
@ 2017 Kurhaus Publishing Kurhaus Media sp. z o.o. sp. k.
Prawa do przekładu polskiego:
@ 2017 Kurhaus Publishing Kurhaus Media sp. z o.o. sp. k.

Wszelkie prawa zastrzeżone.

Żaden z fragmentów książki nie może być przedrukowywany ani poddawany żadnej innej metodzie powielania bez pisemnej zgody Wydawcy. Wyjątek od tej reguły stanowić mogą krótkie cytaty będące elementem tekstów o charakterze krytycznym czy recenzji.

Przekład: Marcin Wąsiel
Redakcja, korekta, skład i łamanie: Kurhaus Publishing
Projekt okładki: Bart Biały

Wydanie elektroniczne 2017

ISBN: 978-83-65301-23-9
EAN: 9788365301239

Dostarczamy wiedzę
www.kurhauspublishing.com

Kurhaus Publishing Kurhaus Media sp. z o.o. sp. k.
Dział handlowy:
kontakt@kurhauspublishing.com, tel. +48 601803503
ul. Cynamonowa 3, 02-777 Warszawa
Born digital

Konwersja publikacji do wersji elektronicznej

Spis treści

Dedykacja
Słownik
Przedmowa
Rozdział 1. Ciało z naszego własnego ciała
Rozdział 2. Wewnętrzny wróg
Rozdział 3. Odkrycie
Rozdział 4. Ukryte życie
Rozdział 5. Klonowanie genu
Rozdział 6. Przypadek pomylonej tożsamości
Rozdział 7. Nowe spojrzenie na raka
Rozdział 8. p53 ujawnia prawdziwe oblicze
Rozdział 9. Główny przełącznik
Rozdział 10. „Strażnik genomu”
Rozdział 11. Jesienne liście i śmierć komórki
Rozdział 12. Myszy i ludzie
Rozdział 13. Czynniki hamujące podział komórki
Rozdział 14. Dymiąca strzelba
Rozdział 15. Tropiąc odciski palców
Rozdział 16. Rak w rodzinie
Rozdział 17. Wątek handlarzy tropeiro
Rozdział 18. Doktor Jekyll i pan Hyde
Rozdział 19. Nowotwory i starzenie się – próba sił?
Rozdział 20. Rewolucja w leczeniu

O autorce
Najważniejsze postaci
Uwagi dotyczące źródeł
Podziękowania
Przypisy

Dla Struana, Isli, Louise i Frasera
– z nadzieją i wiarą, że będą mogli w pełni skorzystać
z owoców niezwykłych badań i wysiłków
podejmowanych na polu walki z rakiem.

Słownik

Allel – jeden z pary genów zajmujących to samo miejsce w chromosomie. Wszystkie geny składają się z takich par. Jeden z alleli genu dziedziczymy po matce, a drugi po ojcu.

Apoptoza – zaprogramowane samobójstwo komórki.

Bakteriofag – wirus atakujący i infekujący bakterie.

Białaczka – nowotwór białych krwinek, które są niezbędnym elementem układu odpornościowego (zob. także „Chłoniak").

„Cechy wyróżniające nowotwory" (ang. „The Hallmarks of Cancer") – historyczny artykuł autorstwa Roberta Weinberga i Douga Hanahana opublikowany w 2000 roku [w magazynie „Cell" – przyp. Kurhaus], opisujący sześć cech wspólnych dla wszystkich typów nowotworów, bez względu na ich etiologię i lokalizację. W 2011 roku autorzy uzupełnili publikację, dodając cztery kolejne cechy.

Chłoniak – nowotwór powstający w tkance limfatycznej, stanowiącej kluczowy składnik układu odpornościowego organizmu. Nowotwory limfocytów (chłoniaki) oraz białych ciałek krwi (białaczki) stanowią ok. 6,5 proc. wszystkich nowotworów.

Czynnik transkrypcyjny – białko, które wiąże się w określonym miejscu z DNA i kontroluje ekspresję znajdujących się w pobliżu genów, aktywując je i dezaktywując zgodnie z potrzebą.

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy; znajdujący się w jądrach komórek żywych organizmów materiał będący nośnikiem informacji genetycznej.

Duży antygen T – gen występujący w DNA małpiego wirusa SV40, odpowiedzialny za wywoływanie nowotworów w komórkach zainfekowanego gospodarza.

Ekspresja genetyczna [inaczej proces regulacji tworzenia białek – przyp. Kurhaus] – proces, w którym aktywowany gen wytwarza białko lub inny produkt pełniący funkcję genu w komórce. Kiedy dochodzi do „nadekspresji" genu, w komórce pojawia się nadmiar białek.

Karcynogen/Kancerogen – czynnik, który może przyczyniać się do powstania i rozwoju nowotworu.

Karcynoma (rak) – rodzaj nowotworu rozwijającego się z tkanki nabłonkowej, do której zaliczamy zewnętrzne błony organów, przewodów oraz naczyń w naszych ciałach, a także naszą skórę. Karcynomy stanowią 80 proc. wszystkich nowotworów (zob. także: sarkoma, białaczka, chłoniak).

Klon – w kontekście niniejszej książki jest to gen stworzony sztucznie z innego genu, będący jego kopią.

Kodon – w cząsteczce DNA jest to jednostka składająca się z trzech nukleotydów (podstawowych elementów składowych genu). Kodony decydują o tym, które aminokwasy zostaną wykorzystane do stworzenia danego białka.

Kultura komórkowa – hodowla komórek poza organizmem, w sterylnych warunkach laboratoryjnych, w ściśle określonej temperaturze i wilgotności, w specjalnie zaprojektowanych pojemnikach, takich jak probówki lub szalki Petriego.

Kultura tkankowa – hodowla tkanek lub komórek pobranych z organizmu. Materiał umieszcza się w naczyniu laboratoryjnym, na przykład w probówce lub na szalce Petriego, na specjalnym podłożu, zazwyczaj z bulionu lub agaru, zawierającym odpowiednie składniki odżywcze.

Linia komórkowa – kultura komórkowa wyhodowana z danego typu komórki i w związku z tym złożona z komórek o jednakowym genotypie.

Mutacja nabycia funkcji – wyrażenie oznaczające rodzaj mutacji genetycznej zmieniającej produkt danego genu (np. białko) w taki sposób, że zyskuje ono dodatkową, nieprawidłową funkcję (zob. także: „Utrata funkcji").

Punkt kontrolny cyklu komórkowego – punkty kontrolne wyznaczają zakończenie każdej kolejnej fazy procesu podziału komórki. W każdym punkcie kontrolnym następuje „kontrola jakości", w trakcie której odbywa się weryfikacja procesu i która decyduje o tym, czy będzie on kontynuowany.

Przerzut – rozsiew komórek nowotworowych z pierwotnej lokalizacji do innych części ciała (stąd przerzuty – nowotwory wtórne).

Mięsak – typ nowotworu powstający w tkance łącznej organizmu, czyli na przykład w mięśniach, kościach i tkance tłuszczowej. Mięsaki stanowią mniej niż 1 proc. wszystkich nowotworów.

Mutacja – zmiana w sekwencji DNA genu lub chromosomu w organizmie powodująca zmianę cech w stosunku do typu macierzystego; jest to proces, w którym zachodzi taka zmiana.

Mutacja somatyczna – mutacja, która – w odróżnieniu od mutacji dziedzicznej, występującej we wszystkich (normalnych i rakowych) komórkach organizmu – pojawia się samoistnie w dojrzałej komórce w ciągu jej życia.

Mutagen – substancja wywołująca mutację.

Mutant (zmutowany) – coś, co uległo mutacji (zob. wyżej).

Nukleotyd – nukleotydy to podstawowe elementy składowe DNA, które układają się jeden na drugim, jak miniaturowe klocki Lego, tworząc długie wstęgi podwójnej helisy DNA.

Onkogen – gen, który może wywołać powstanie nowotworu. Zazwyczaj jest to gen, który normalnie pełni określoną funkcję w procesie rozwoju i podziału komórek, ale uległ mutacji i utracił zdolność prawidłowej reakcji na sygnały kontrolne.

Onkogeniczny – powodujący rozwój nowotworu.

Onkologia – nauka o nowotworach (stąd onkolog – specjalista w zakresie badania lub leczenia nowotworów).

Postdoc – naukowiec z doktoratem, który prowadzi badania lub odbywa dalsze studia pod kierunkiem bardziej doświadczonych profesorów, by zyskać dodatkowe wykształcenie lub umiejętności potrzebne do dalszego rozwoju i kariery [w modelu anglosaskim – przyp. Kurhaus].

Przeciwciało – przeciwciała to „żołnierze" układu odpornościowego. Poruszają się swobodnie w krwiobiegu, wyszukując intruzów, takich jak bakterie lub wirusy i oznaczają je, by ułatwić ich zniszczenie. Przeciwciała są przygotowane przez układ odpornościowy w taki sposób, by łączyć się tylko z określonymi celami, co sprawia, że są doskonałym narzędziem

umożliwiającym „wyszukiwanie” wybranych rodzajów molekuł podczas badań i doświadczeń.

Rekombinowane DNA – DNA, które zostało stworzone sztucznie przez połączenie materiałów genetycznych pochodzących od różnych organizmów.

Senescencja – w niniejszej książce termin ten opisuje stan, w którym komórka utraciła zdolność do podziału, ale pozostaje żywa i aktywna.

Supresor nowotworowy/gen supresorowy – gen, którego funkcją jest powstrzymywanie komórek przed złośliwą transformacją.

Transformacja – w niniejszej książce termin ten używany jest do opisania procesu, w którym komórka nabiera cech nowotworu (powszechnie nazywanego „transformacją złośliwą”).

Typ dziki – w odniesieniu do genu oznacza gen „normalny”, funkcjonujący zgodnie z intencją natury; to przeciwieństwo genu „zmutowanego” działającego nieprawidłowo.

Utrata funkcji – wyrażenie oznaczające rodzaj mutacji genetycznej, która sprawia, że gen staje się bezużyteczny – zmutowany gen nie jest w stanie wytworzyć białka albo białko wytwarzane przez ten gen nie jest w stanie spełnić swojej funkcji. W przypadku większości, lub nawet wszystkich genów powstrzymujących rozwój raka – supresorów – z wyjątkiem p53, mutacje prowadzą do utraty tej funkcji.

Złośliwy – w języku medycznym złośliwy oznacza to samo, co zrakowaciały, czyli zdolny do rozprzestrzeniania się w organizmie.

Przedmowa

Skąd my [naukowcy] czerpiemy nasze pomysły i inspirację do rozwiązywania problemów? Z tego samego miejsca, z którego kompozytor bierze natchnienie do pisania utworu, a malarz do tworzenia obrazu. Biorą się one z miejsca, którego nie znacie. To ten sam błysk inspiracji, związany z tym samym kolorem – i podobną chwałą, co chęć zmieniania świata na lepsze.

Gerard Evan

Luana Locke to pełna życia kobieta wkraczająca w wiek średni. Ma ładną okrągłą twarz, duże orzechowe oczy i ciemne włosy, spływające falami aż do ramion. Kiedy rozmawiamy w jednej z zatłoczonych kawiarni Toronto nad filiżanką spienionego cappuccino, wprost emanuje zdrowiem. Gdybym nie znała jej historii, za nic na świecie nie przyszłoby mi do głowy, że w jej życiu stale obecne były choroba, ból i cierpienie po stracie. Luana zwyciężyła chorobę nowotworową, którą zdiagnozowano u niej, gdy miała dwadzieścia cztery lata. Jej doświadczenia z rakiem sięgają jednak dużo dalej.

Kiedy miała trzy latka jej dziewięcioletnia wówczas siostra Manuela zmarła na raka mózgu. Z tamtego okresu Luana pamięta głównie czas spędzany pod opieką krewnych, u których zostawała, gdy rodzice jeździli do szpitala, a także rozpacz matki, kiedy Manuela w końcu odeszła. I swoje bezsilne pragnienie, by jeszcze kiedykolwiek zobaczyć uśmiech mamy.

„Kiedyś podałam mamie chusteczkę i bardzo się zezłościłam, gdy wydmuchała w nią nos. Pomyślałam: *O nie, przecież dałam ci to, żebyś wytarła łzy*. Pamiętam, że była bardzo smutna". Mała dziewczynka nie zdawała sobie sprawy z tego, że jej mama, Giulietta, także już wtedy chorowała. Ona i ojciec Luany, z zawodu glazurnik, kilka lat wcześniej przybyli do Kanady z Włoch. Chcieli wykorzystać fakt, że było tam wówczas ogromne zapotrzebowanie na doświadczonych rzemieślników. Wkrótce jednak planowali wrócić do Włoch – po części także dlatego, że ciotka Luany, Rina (dwudziestodziewięcioletnia bliźniaczka Giulietty), zmarła właśnie na raka piersi, osierociwszy czworo małych dzieci. Plany te zniweczyła diagnoza córki – rak mózgu – oraz fakt, że także Giulietta musiała poddać się leczeniu: chemioterapii i radioterapii raka piersi.

„Mama przeszła mastektomię. Mam z tego okresu kilka bardzo wyraźnych wspomnień" – mówi Locke. „Pamiętam, jak obserwowałam ją, gdy się ubierała, nakładała makijaż, układała włosy, a później wsuwała protezę piersi pod bluzkę". Dla małej dziewczynki stanowiło to jeden z elementów codzienności, aż do czasu, gdy rak matki – który początkowo odpowiedział na leczenie – powrócił, rozprzestrzeniając się do kości, i ostatecznie pozbawił ją życia. Luana miała wtedy sześć lat. Dziś w przejmujący sposób opowiada o bólu i pustce, które wypełniły jej dom rodzinny – pozostali w nim już tylko ojciec Luany, jej brat David i ona sama – oraz o ogarniającym ją co noc strachu, że „potwór" zaatakuje raz jeszcze i zabierze kolejną ukochaną osobę.

Tymczasem kolejną osobą, która usłyszała diagnozę, okazała się ona sama. Miała dwadzieścia cztery lata i była w ósmym miesiącu ciąży, gdy zauważyła malutki strupek na jednej

z brodawek piersi. Co jakiś czas odpadał, pozostawiając niewielką rankę z wysiękiem. Ta ponownie zamieniała się w strup, nie chciała się goić. Chcąc karmić piersią mające wkrótce się narodzić dziecko, podenerwowana nie dającą się zaleczyć zmianą, wybrała się do lekarza. Ten przepisał jej maść. Nikt z personelu medycznego prowadzącego jej ciążę nie przywiązywał do tego wagi, dopóki strupek – pomimo stosowania różnych medykamentów – nie zaczął się powiększać. Wówczas lekarz Luany skierował ją do Donny McRitchie – dermatolożki. Ta zleciła biopsję.

„Dr McRitchie powiedziała mi: «Wyniki dostaniemy prawdopodobnie za tydzień. Zadzwonię z informacją»" – wspomina tamten okres Locke. „Pamiętam, że poszłam do samochodu i rozpłakałam się. Nie dlatego żeby coś mnie bolało, bo przecież dostałam miejscowe znieczulenie. Po prostu miałam w uszach dźwięk nożyczek i wiedziałam, że wycięto mi fragment tkanki, a to wprawiało mnie w przedziwny stan. Dlatego właśnie zaczęłam płakać w aucie. Potem jednak przestałam i zaczęłam być zła na siebie. Pomyślałam: Nie bądź dzieckiem! Przypomnij sobie, przez co przeszła twoja matka. Na litość boską, ona straciła całą pierś, a ty się rozklejasz, bo wycięli ci kawałeczek skóry. Dorośnij, dziewczyno! Byłam dla siebie trochę ostra, prawda? Pomyślałam, że trzeba się wziąć w garść i ruszyć do przodu!".

Luana nie była gotowa przyznać, choćby sama przed sobą, jak bardzo się boi. Będąc z natury optymistką, z całych sił trzymała się myśli, że to niemożliwe, by piorun uderzył dwa razy w to samo miejsce. Gdy nachodziły ją złe przeczucia, próbowała je rozpędzić, tłumacząc sobie: Przecież to śmieszne. Czy ktoś kiedyś słyszał, żeby rak piersi objawiał się w taki sposób? Nie ma

żadnych guzków, niczego tu nie ma. A poza tym, masz dopiero dwadzieścia cztery lata... „Rety, dużo się wtedy strofowałam!" – wspomina dziś ze śmiechem. Jednak wynik, który przyszedł nadspodziewanie szybko, okazał się niepokojący: u Luany wykryto chorobę Pageta, rodzaj nowotworu piersi, który często bywa mylony z egzemą – do czasu, gdy guz rozwijający się w ukryciu pod raną osiągnie zaawansowaną postać. Mając na uwadze wywiad rodzinny, opiekujący się Luaną onkolog rekomendował najbardziej radykalny rodzaj leczenia, czyli mastektomię.

Diagnoza była szokiem, jednak Luana najbardziej martwiła się o ojca. „Tamta rozmowa z nim była jednym z najtrudniejszych momentów w moim życiu" – mówi cicho, spuszczając wzrok i mieszając piankę w filiżance. „Tyle już wycierpiał, że nie chciałam, by przechodził przez to raz jeszcze". Franco jednak zachował zimną krew. Wyraźnie nakazał córce oraz przerażonemu zięciowi, by nie oglądali się na historie matki i siostry Luany sprzed dwudziestu lat. „Od tamtego czasu wiedza medyczna bardzo się rozwinęła" – powiedział.

W ciągu kilku tygodni od diagnozy Luana urodziła przez cesarskie cięcie syna, Lucasa, a parę dni później poddała się mastektomii. Badanie usuniętej tkanki potwierdziło bardzo agresywny typ nowotworu, więc lekarze postanowili profilaktycznie usunąć także drugą pierś. W niej również znaleziono zmiany przedrakowe. Luana starała się walczyć z własną chorobą pośród bolesnych wspomnień i związanej z nimi straszliwej niepewności, koncentrując uwagę na nowonarodzonym synu. „Wiedziałam, że muszę przeżyć i zrobić wszystko, co tylko będzie potrzebne... I rzeczywiście, opieka nad synkiem pochłonęła mnie całkowicie" – mówi dziś.

„Nie pozwalałam sobie myśleć o śmierci. Była zbyt ostateczna, zbyt poważna, bym mogła stawić jej czoła. Dlatego najgorszym, z czym mierzyłam się w myślach, była perspektywa utraty włosów. Zawsze miałam długie włosy i właśnie obawa, że je stracę była największą, na jaką sobie wtedy pozwalałam. Nie dopuszczałam do siebie myśli o śmierci... o tym, że mnie nie będzie i moje dziecko zostanie samo" – wspomina Luana, kiwając głową.

Luana ma dziś 41 lat i dotąd nie miała nawrotu choroby, choć na przestrzeni lat czworo członków jej najbliższej rodziny we Włoszech i Ameryce przeszło operacje usunięcia guzów, a synek jej brata, Marco, zmarł na raka w wieku pięciu lat. Chociaż do niedawna nikt o tym nie wiedział, źródłem problemów jej rodziny jest mutacja genu o prozaicznej nazwie p53 – nadanej mu po prostu dlatego, że wytwarza białko o masie cząsteczkowej 53 tys. daltonów (Da).

Kiedy po raz pierwszy opisano go w 1979 roku, naukowcy nie mieli pojęcia o dalekosiężnym znaczeniu tego odkrycia. P53 dopiero z czasem zaczął ujawniać swe prawdziwe oblicze – jednego z najważniejszych aktorów w dramacie jakim jest choroba nowotworowa. Pełni on rolę swoistego głównego przełącznika w naszych komórkach: jego głównym zadaniem jest zapobieganie rozwijaniu się guzów w wyniku uszkodzenia DNA.

P53 stał się najczęściej badanym genem w historii biologii molekularnej, opisanym w ponad 70 tys. prac badawczych. Skupił wokół siebie całą społeczność naukowców, nadzwyczaj otwartych i chętnych do współpracy – pomimo tak charakterystycznej dla tej branży rywalizacji. Co dwa lata zjeżdżają oni z różnych ośrodków na całym świecie, by wziąć udział w kilkudniowej konferencji – twórczej, nieco ezoterycznej debacie, która wnosi

nowe elementy do tej niezwykłej układanki, i tak przesuwa starsze, by składały się na pełniejszy obraz.

P53 to najczęściej mutujący gen w przypadku nowotworów u ludzi. Jego uszkodzenie sprawia, że informacje, których jest nośnikiem, ulegają zniekształceniu – dokładnie tak jak uszkodzenie pliku na płycie CD lub w komputerze powoduje utratę zawartych w nich danych. W sytuacjach, w których nie mamy do czynienia z mutacja, prawidłowe funkcjonowanie komórki zakłóca zwykle jakieś inne zachodzące w niej „nietypowe wydarzenie". „W rozmaitych nowotworach możemy mieć do czynienia z mutacją także innych genów, jednak p53 to jeden z tych, które pojawiają się w każdym przypadku. Jest wyjątkowy, bo stanowi wspólny mianownik wszystkich typów raka" – zauważa Bert Vogelstein z Uniwersytetu Johnsa Hopkinsa w Baltimore, w stanie Maryland.

Vogelstein, który urodził się i dorastał w latach 40. w cieniu szpitala Johnsa Hopkinsa, i który studiował medycynę na tamtejszym uniwersytecie, był zaangażowany w badania nad p53 od samego początku. To jego laboratorium, mieszczące się dziś w nowoczesnym, przeszklonym, pełnym światła wieżowcu, górującym nad Baltimore i ciepłą czerwoną cegłą starego szpitala, wypracowało wiele najistotniejszych wniosków dotyczących funkcjonowania genu. „Myślę, że dziś już uzasadnione jest twierdzenie, że to niemożliwe – albo bardzo mało możliwe – by złośliwy nowotwór rozwinął się bez aktywności uszkodzonego p53".

* * *

Po raz pierwszy usłyszałam o p53 w 1996 roku, kiedy wróciłam do Szkocji po siedmioletnim pobycie w Republice Południowej

Afryki (RPA), gdzie pracowałam jako korespondent „New Scientist" i Radia BBC i opisywałam dla Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) spustoszenia, jakie na tym kontynencie wywołała empidemia AIDS. W Szkocji zaczęłam rozglądać się za ciekawymi tematami naukowymi i tak trafiłam do laboratorium Davida Lane'a, jednego z czterech odkrywców p53. Zaintrygowana tym, czego się dowiedziałam, uzyskałam zgodę BBC na przygotowanie audycji dokumentalnej i poleciałam na Kretę, by wziąć udział w jednym z odbywających się co dwa lata spotkań społeczności naukowców badających p53. Organizowano je w centrum konferencyjnym położonym nad malowniczą zatoką z widokiem na prywatną plażę i lśniącą taflę morza. Pod koniec pierwszej sesji czułam się oszołomiona – nie rozumiałam ani słowa z wystąpień kolejnych naukowców i miałam wrażenie, jakby mówili w obcym języku.

Podczas kolacji siedziałam przy stoliku obok Petera Halla, niewysokiego, błyskotliwego mężczyzny o ironicznym sposobie bycia, znakomitego nauczyciela, naukowca z Dundee, z którym już wcześniej przygotowywałam materiały na temat p53. W pewnym momencie pochylił się do mnie i szepnął: „Nie panikuj. Żeby zrozumieć tę debatę potrzebujesz tego...". Wskazał mi najważniejszych ludzi, z którymi powinnam porozmawiać i najciekawsze prezentacje na temat badań nad p53. Od razu poczułam się lepiej, a po czterech dniach wróciłam z Krety z dostateczną ilością materiałów wystarczająco dobrych, by przygotować nie jedną, ale dwie audycje, w których mogłam przedstawić najświeższą wiedzę naukową na temat tego białka, a także opowiedzieć o wiązanych z nim nadziejach i możliwościach opracowania nowych metod leczenia nowotworów.

Spotkanie odbyło się w 1998 roku. W kolejnych latach wielokrotnie wracałam do opowieści o białku p53 zawsze, kiedy jakieś nowe elementy układanki wzbudzały moje zainteresowanie. Tak było przy okazji przypadkowego odkrycia dokonanego podczas nieudanego eksperymentu z modyfikowanymi genetycznie myszami, kiedy to wykazano ścisły związek między rozwojem nowotworów a starzeniem się, albo w sytuacji, kiedy p53 odegrało decydującą rolę w batalii z przemysłem tytoniowym, dostarczając ostatecznego dowodu na to, że palenie powoduje raka. Patrzyłam, jak morale naukowców rosło lub malało w zależności od tego, czy nowe informacje i odkrycia jasno wskazywały dalszy kierunek, posuwając badania do przodu, czy też mnożyły wątpliwości lub prowadziły ich na manowce.

Wraz z upływem lat zaczęłam zdawać sobie sprawę, że ta historia p53 jest zbyt dobra, żeby pozostawić ją tylko dla czytelników beznamiętnych publikacji naukowych, pisanych hermetycznym językiem, niezrozumiałym dla laika i uniemożliwiającym mu zrozumienie istoty nawet najbardziej doniosłych odkryć w tej dziedzinie. Tak narodził się pomysł książki. Nie jest to jednak prosta historia, bo w nauce nic nie jest proste. Nieudane doświadczenia i obalane teorie pozwalają rozwijać wiedzę w takim samym stopniu, jak teorie prawdziwe, dające się udowodnić. Trzeba mieć naprawdę otwarty umysł i dużo odwagi, by dostrzec, że brak dowodów – lub całkowicie sprzeczny z założeniami wynik eksperymentu – to równie ważny wkład w badania i warunek postępu. W swoich dążeniach do poznania istoty i sposobu funkcjonowania nowotworów naukowcy badający p53 ulegali wpływom naukowych

dogmatów i sile paradygmatu równie często, jak ich koledzy z innych dziedzin.

Amerykańska astrofizyczka, Janna Levin[1], napisała w swoim komentarzu dla magazynu „New Scientist", że „nauka bez opowieści zamienia się w ciąg równań lub wykaz danych". Postawiłam więc sobie za cel trzymać się jak najdalej od samych prac naukowych, a w zamian przedstawić opowieść o pełnych pasji, zaangażowania i mądrości ludziach, którzy je tworzyli, pomagając w ten sposób odkryć najgłębsze tajemnice raka.

UWAGA OD AUTORKI

Starałam się ze wszystkich sił uniknąć w swojej pracy naukowego żargonu. Jest jednak jedno określenie, którego postanowiłam nie zmieniać na bardziej zrozumiałe. Chodzi o „typ dziki" [ang. *wild type*], określenie odnoszące się do statusu białka p53. Zasadniczo „typ dziki" oznacza białko „normalne", funkcjonujące zgodnie z intencjami natury, w odróżnieniu od białka „zmutowanego", które działa nieprawidłowo. „Typ dziki" to określenie tak powszechnie używane przez biologów, w tym także przez moich rozmówców – a przy tym znacznie bardziej sugestywne niż „normalny" – że zdecydowałam się go nie zmieniać. Jestem przekonana, że Czytelnicy mi to wybaczą.

ROZDZIAŁ 1

Ciało z naszego własnego ciała

...w którym dowiadujemy się, że słowem „nowotwór” określamy tak naprawdę ponad 200 różnych chorób o kilku cechach wspólnych – najważniejszą z nich jest sposób funkcjonowania białka p53. Jeśli działa ono prawidłowo, nie dojdzie do zezłośliwienia komórki.

* * *

Nowotwory niszczą człowieka w sposób wyjątkowy i przerażający, ponieważ są naszymi własnymi komórkami, które w jakiś sposób wymknęły się spod kontroli i zmieniły w drapieżniki namnażające się w organizmie, by zaatakować zdrowe tkanki.

Peyton Rous[2]

„Pytanie, które prześladuje mnie przez całą moją karierę, brzmi: dlaczego rak występuje tak rzadko?” – kończy swój wywód Gerard Evan, profesor biologii molekularnej Uniwersytetu Kalifornijskiego w San Francisco oraz Uniwersytetu Cambridge w Wielkiej Brytanii. Następnie robi pauzę, by jego słowa lepiej zapadły mi w pamięć. Wie, że ta uwaga mnie poruszy, gdyż według cytowanych w mediach statystyk, obraz jest raczej niewesoły – u jednej trzeciej z nas lekarze zdiagnozują nowotwór

w którymś okresie życia, a jedna czwarta z nas umrze na tę chorobę. Ale Evan, który rozmawia ze mną o swoich długoletnich badaniach genów, siedząc w gabinecie w Sanger Building, położonym w zielonym zakątku Cambridge, patrzy na nowotwory z perspektywy komórek, a nie całego człowieka. By wywołać raka wystarczy jedna zbuntowana komórka, w której mechanizmy regulacyjne przestają funkcjonować prawidłowo, tymczasem przez 50 lub 60 lat miliardy albo nawet biliony innych komórek w naszych ciałach nieustannie rozwijają się, dzielą i replikują, nie tworząc guzów. Dwie trzecie populacji nigdy nie zachoruje na raka. „Chodzi mi o to, że, gdyby to była loteria, nikt by na to nie postawił!" – dodaje Evan. „Oczywiście nowotwory się zdarzają, ale jest jasne, że wykształciliśmy [jako organizmy] niezwykle skomplikowane i skuteczne mechanizmy obronne, które ograniczają spontaniczny rozwój autonomicznych komórek w naszych ciałach. I nawet jeśli sami bombardujemy się rozmaitymi mutagenami i karcynogenami, nawet jeśli robimy wszystkie rzeczy, których nie powinniśmy, to i tak wciąż najwięcej ludzi umiera na atak serca, a nie na raka".

Miarą tego, jak odporne na degenerację są nasze komórki może być fakt, że spory fragment naszego DNA – czyli stworzonej przez naturę instrukcji budowy i obsługi ludzkiego ciała – wywodzi się od pierwotnego organizmu jednokomórkowego, nazywanego „ostatnim uniwersalnym wspólnym przodkiem" całego życia na ziemi [ang. *last universal common ancestor*, LUCA]. Hipotezę jego istnienia jako pierwszy zaproponował Karol Darwin w swojej pracy *O powstawaniu gatunków* opublikowanej w 1859 roku. Innymi słowy, niektóre z naszych genów mają ponad 3,5 miliona lat i były wiernie przekazywane z pokolenia na pokolenie przez wieki.

Termin „nowotwór” odnosi się nie do jednej, ale do około 200 różnych chorób, które łączy jedna cecha – wszystkie one biorą się od uszkodzenia i nieprawidłowości w funkcjonowaniu pojedynczej komórki. Ogromna większość nowotworów – ponad 80 proc. – to typ karcynoma, który powstaje z tkanki nabłonkowej, do której zaliczyć należy zewnętrzne błony wszystkich organów, przewodów i naczyń oraz jam w naszych ciałach, a także skórę. Z kolei tkanka łączna, która jest elementem spajającym i konstrukcyjnym ciała, zapewniającym podparcie i wypełnienie dla narządów oraz innych tkanek (w jej skład wchodzą na przykład kości, chrząstki, tkanka włóknista, czyli ścięgna i więzadła, a także kolagen i tkanka tłuszczowa) wydaje się wyjątkowo odporna na zrakowacenie. Nowotwory z tkanki łącznej, typu sarkoma (mięsaki), stanowią zaledwie 1 proc. przypadków.

Wciąż nie wiadomo, dlaczego te dysproporcje są tak duże, choć istnieje wiele różnych teorii. Być może komórki tkanki nabłonkowej dzielą się znacznie częściej niż komórki tkanki łącznej i dlatego są bardziej podatne na mutacje? Na przykład proces odnowy naszej skóry przebiega bardzo intensywnie. W procesie tym komórki w warstwie podstawnej naskórka dzielą się, a następnie różnicują i dojrzewają, stopniowo przesuwając się z głębszych warstw ku zewnętrznej. Tu zostają ostatecznie zrzucone (widzimy je po każdej kąpieli w postaci brudnej obwódki w wannie). Również wyściółka jelit nieustannie się odnawia, a zrzucone komórki są wydalane. Jednakże argumentem przeciw hipotezie, że to wysoka aktywność proliferacyjna[3] jest głównym czynnikiem ryzyka rozwoju nowotworów złośliwych w tkance nabłonkowej jest fakt, że najczęściej ulegają zrakowaceniu wcale nie te komórki nabłonkowe, które dzielą się

najszybciej. Zdaniem niektórych najwięcej nowotworów rozwija się w tkance nabłonkowej, bo jej komórki stanowią pierwszą linię oporu przed światem zewnętrznym i częściej wchodzą w kontakt z czynnikami rakotwórczymi. Jednak również ta argumentacja ma słabe punkty. W niektórych narządach, jak choćby w prostacie, komórki nabłonkowe i komórki tkanki łącznej są jednakowo narażone na kontakt z karcynogenami, a mimo to komórki nabłonkowe są znacznie bardziej podatne na atak.

Poszukując rozwiązania tej zagadki, pracownicy pewnego laboratorium pobrali próbki zdrowej tkanki z piersi, oddzielili komórki tkanki łącznej od komórek nabłonkowych i obserwowali ich reakcję na atak z zastosowaniem chemicznych karcynogenów. Ku ich zaskoczeniu, oba rodzaje komórek zareagowały zupełnie inaczej, choć nie uzyskano wyjaśnienia, dlaczego. Odpowiedź na to pytanie jest Świętym Graalem badaczy. Pozwoliłaby ona na wykrycie w pancerzu raka szczelin, w które można by uderzyć nowymi lekami.

Nowotwór zazwyczaj rozwija się w tkance z puli komórek macierzystych, które są odpowiedzialne za naprawę i wymianę komórek odbywającą się w ramach normalnych procesów regeneracyjnych w organizmie. Czasem mijają całe lata lub dekady zanim ze zmutowanej komórki powstanie dający się wykryć guz. Okres jego rozwoju zależy od tempa rozpadu mechanizmów komórkowych w wyniku mutacji i/lub utraty kluczowych genów, które regulują rozwój, replikację, naprawę oraz śmierć komórki w odpowiednim czasie. Mutacje te występują niezależnie i, co niezwykle istotne, nie prowadzą do śmierci komórki, która powinna nastąpić zawsze, gdy komórka jest uszkodzona. Rozwijający się guz jest pasożytem, rywalizuje

o pokarm i tlen z okolicznymi zdrowymi komórkami. Nie urośnie do średnicy większej niż 1–2 mm, jeśli nie zapewni sobie niezbędnego dopływu krwi.

Tym, co odróżnia guz złośliwy od łagodnego, jest jego zdolność do rozprzestrzeniania się – wysyłania mikroskopijnych odrostów, które penetrują ściany okolicznych naczyń krwionośnych i atakują sąsiednie tkanki, a także rozsiewania zmutowanych komórek do bardzo odległych miejsc przy pomocy krwioobiegu lub układu limfatycznego. Zwłaszcza układ krwionośny jest skuteczną drogą rozprzestrzeniania się nowotworu w organizmie, ponieważ krew przenosi zmutowane komórki do najważniejszych organów i punktów filtracyjnych, takich jak płuca czy wątroba.

Nasza wiedza na temat mechanizmów rozwoju nowotworów rośnie w rewolucyjnym tempie od 40 lat, pośród kolejnych przełomów w dziedzinie biologii molekularnej, które pozwalają naukowcom coraz lepiej poznawać i rozumieć sposób funkcjonowania komórek – czyli klocków, z których zbudowane jest całe życie na Ziemi.

Jednak dla badaczy nowotworów sama ilość pozyskiwanych i gromadzonych danych może być czasem nie do zniesienia. Robert (Bob) Weinberg uczestniczy w badaniach od początku lat 60. i odegrał w rewolucji [onkologicznej] istotną rolę. „Ilość i różnorodność informacji po prostu nas przytłacza" – mówi do grupy kolegów naukowców zgromadzonych w jednej z sal Massachusetts Institute of Technology (MIT), w trakcie swojego wystąpienia poświęconego badawczym i osobistym doświadczeniom, które go ukształtowały.

„Pamiętam, że kiedy studiowałem, liczyły się tak naprawdę dwa czasopisma – «Journal of Molceular Biology» i «PNAS» («Proceedings of the National Academy of Science»). I to było

wszystko. A dzisiaj?" – Weinberg wzrusza ramionami i rozkłada ręce. „Jest ich więcej niż gwiazd na niebie. W samym PubMed[4] można znaleźć od 12 do 15 mln artykułów i żeby się w tym jakoś orientować, muszę ciągle pytać o coś kolegów, którzy na bieżąco śledzą stan poszczególnych badań i potrafią wydobyć z tej masy najważniejsze informacje". Jak mówi Weinberg, naukowcy pracujący w laboratoriach potrafią dziś generować ważne dane 10 tys. razy szybciej niż w czasach, kiedy on zaczynał swoje badania.

W swoim własnym laboratorium w MIT, gdzie spędził większość życia, Weinberg kładzie nacisk przede wszystkim na to, by jego współpracownicy wyciągali wnioski z eksperymentów oraz obserwacji i proponowali nowe rozwiązania, a nie tylko pozyskiwali dane. Nie dziwi zatem fakt, że jednym z zadań, które sobie postawił, było choć częściowe uporządkowanie ogromu informacji na temat raka, gromadzonych w sposób nieco przypominający chaotyczny rozwój samej choroby. Podczas konferencji na Hawajach w 1998 roku Weinberg wspólnie z kolegą Dougiem Hanahanem, biologiem molekularnym z MIT, wybrał się na wycieczkę w dół krateru wulkanu. Wymieniając się opiniami i dyskutując o typowych problemach, naukowcy wpadli na pomysł napisania rozprawy przedstawiającej i objaśniającej najważniejsze, zdaniem Weinberga, wnioski i spostrzeżenia z dotychczasowych badań.

„Badania nad rakiem to bardzo obszerna dziedzina, pełna różnorodnych odkryć i wniosków, postanowiliśmy zatem poszukać jakichś ukrytych podstawowych reguł, które pozwoliłyby te wszystkie odkrycia uporządkować" – mówi Weinberg. „Podczas pracy ustaliliśmy sześć charakterystycznych cech komórek rakowych występujących w niemal wszystkich typach tej choroby i potwierdzających istnienie guza

nowotworowego". Artykuł „Cechy wyróżniające nowotwory"[5] ukazał się w 2000 roku i wbrew obawom Hanahana i Weinberga, którzy znali losy większości prac naukowych, powszechnie czytanych i szybko zapominanych, nie przepadł jak kamień w wodę, lecz stał się jednym z kamieni węgielnych w dziedzinie biologii nowotworów. Do dziś stanowi rodzaj ramy, w której układa się kolejne elementy układanki. Opisane przez autorów cechy dające się zaobserwować u niemal wszystkich komórek rakowych są następujące (w dużym skrócie):

- siły napędzające wzrost i podział pochodzą raczej z wnętrza zmutowanych komórek niż z zewnątrz,
- komórki rakowe są niewrażliwe na działanie sił, które zwykle w odpowiednim czasie blokują dalszy podział komórkowy,
- są odporne na działanie mechanizmów, które w normalnych warunkach eliminują i usuwają uszkodzone komórki,
- są nieśmiertelne w takim znaczeniu, że mogą się dzielić bez końca, podczas gdy normalne komórki, kontrolowane przez wewnętrzny „zegar", mogą się dzielić tylko określoną ilość razy, po czym starzeją się i umierają,
- wytwarzają i utrzymują własny system dopływu krwi,
- mogą rozprzestrzeniać się do innych narządów i tkanek, tworząc ogniska satelickie, czyli przerzuty.

W 2011 roku naukowcy zaktualizowali i uzupełnili swój artykuł, dodając do niego kolejne cechy: nieprawidłowy metabolizm, szczególnie jeśli chodzi o sposób wykorzystania glukozy do [beztlenowego] uzyskiwania energii, a także zdolność do uciekania spod nadzoru immunologicznego.

Co najważniejsze dla naszej historii, białko p53 ma wpływ na wszystkie te cechy. „Czytając artykuł Hanahana i Weinberga

stwierdziłem, że to genialna i trafna koncepcja" – mówi Pierre Hainaut, który badaniom nowotworów poświęcił wiele lat pracy w działającej przy Światowej Organizacji Zdrowia Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem z siedzibą w Lyonie. „Z czasem jednak zacząłem się zastanawiać, co łączy te wszystkie cechy. Byłem przekonany, że musi to być jakiś spójna koncepcja, a nie tylko kolejne elementy. Wiedziałem, że jest coś, co trzyma je razem. A potem przyszło olśnienie – przecież to p53!".

„Istnieje wiele genów, które odgrywają mechaniczną rolę w rozwoju poszczególnych cech, a niektóre z nich mają wpływ nawet na dwa lub trzy elementy. Jednak to właśnie gen białka p53 jest tym, który łączy wszystkie te cechy. Oznacza to, że z punktu widzenia komórki istnieje jeden podstawowy warunek powstania nowotworu – jest nim «wyłączenie» p53. Jeśli białko jest «włączone», czyli funkcjonuje prawidłowo, rak się nie rozwinie".

Hainauta – wysokiego, smukłego Belga z szelmowskim uśmiechem, pełnego chłopięcego entuzjazmu, a jednak poważnego za grubymi szkłami okularów – intryguje szczególnie wielość ról, które p53 odgrywa w funkcjonowaniu komórki. Właśnie to zainteresowanie sprawia, że uczony często opuszcza swoje laboratorium, by badać związek między spleśniałymi orzechami i rakiem wątroby w Gambii, rozmawiać z brazylijskimi rodzinami, u których zapadalność na nowotwory jest dziedziczna, lub przemierzać inne kraje, od Iranu po Chiny, w poszukiwaniu przykładów wpływu działania p53 na nasze codzienne życie. „P53 może przestać funkcjonować [poprawnie] z wielu różnych powodów" – dodaje Hainaut. „Najczęstszym z nich jest mutacja, kolejnym może być utrata jednej z kopii genu. Są jednak również inne przyczyny, jak na przykład «wyłączenie», degradacja czy

przemieszczenie. Powtarzam jednak, jeśli komórka zachowa nietknięte prawidłowo funkcjonujące białko p53, z pewnością nie rozwinie się z niej rak".

STAROŻYTNA CHOROBA

Rak to choroba tak stara jak sama ludzkość. Wspominają o niej najstarsze istniejące teksty medyczne – starożytne egipskie papirusy pochodzące z XXX – XV w. p.n.e. Pozostałości nowotworu odkryto w znalezionych fragmentach kobiecej czaszki z epoki brązu, datowanej na lata 1900–1600 p.n.e., a także w zmumifikowanych zwłokach starożytnych Egipcjan i peruwiańskich Inków. W 1932 roku paleoantropolog Louis Leakey badając Wielki Rów Afrykański znalazł ślady nowotworów kości w skamieniałych szczątkach jednego z naszych przodków, *homo erectus*, który przemierzał afrykańskie sawanny ok 1,3–1,5 mln lat temu.

Tak naprawdę nowotwory istnieją prawdopodobnie od chwili, gdy z „ostatniego uniwersalnego wspólnego przodka" (LUCA) rozwinęły się pierwsze organizmy wielokomórkowe. W 2003 roku zespół naukowców z Northeastern Ohio Universities College of Medicine pod kierownictwem radiologa Bruce'a Rotschilda przeprowadził badania w amerykańskich muzeach, skanując fragmenty ponad 700 zgromadzonych w nich szkieletów dinozaurów. Członkowie zespołu odkryli ślady nowotworów w 29 analizowanych próbkach pochodzących od ornitopodów zwanych hadrozaurami, które żyły w późnej kredzie, ok. 70 mln lat temu. Naukowcy znaleźli również zmiany nowotworowe w kościach dinozaurów pochodzących z okresu jurajskiego, między 199 a 145 mln lat temu.

Hipokrates, żyjący ok. 460 r. p.n.e., jako pierwszy dostrzegł różnicę między łagodnymi guzami, które nie atakują sąsiadujących tkanek ani nie rozprzestrzeniają się do innych części organizmu, a guzami złośliwymi, które dają przerzuty. Naczynia krwionośne rozgałęziające się na naroślach, które znajdował u swoich pacjentów, przypominały mu odnóża kraba, więc nadał tajemniczej chorobie nazwę *karkinos*, czyli po grecku „krab"/„rak". Tłumaczy się ją jako karcynoma. Hipokrates i współcześni mu lekarze wierzyli, że rak jest jednym ze skutków ubocznych melancholii. Jeszcze w średniowieczu zarówno medycy, jak i pacjenci byli przekonani o nadprzyrodzonych źródłach choroby, o jej związku z grzechami, demonami i nagromadzeniem czarnej żółci w organizmie chorego.

Ta oparta na lęku teoria obowiązywała przez niemal 2 tys. lat, aż do XVI wieku, kiedy to została obalona przez Andreasa Versaliusa, mieszkającego w Padwie flamandzkiego lekarza badającego anatomię człowieka. Versalius przeprowadzał sekcje zwłok swoich zmarłych pacjentów, a także straconych przestępców, których ciała dostarczał mu zafascynowany jego pracą miejscowy sędzia. W efekcie ogłosił publicznie, że czarna żółć nie istnieje, nie znalazł jej ani w chorych, ani w zdrowych ciałach.

Kolejne dwa wieki minęły zanim zaczęto dostrzegać związek między działaniem czynników zewnętrznych i rozwojem nowotworu. W 1761 roku John Hill, londyński lekarz i botanik opublikował broszurę zatytułowaną *Caution Against Immoderate Use of Snuff* (pol. *Ostrzeżenie przed nadmiernym używaniem tabaki*), w której opisywał przypadki pacjentów z nowotworami jamy nosowej, powstałymi wskutek wąchania tabaki. Z kolei w 1775 roku angielski chirurg Percivall Pott opisał liczne przypadki

raka moszny u bardzo młodych mężczyzn, których łączyło jedynie to, że w dzieciństwie pracowali jako kominiarze, przez co ich ciała narażone były na ciągły kontakt z sadzą. W osiemnastowiecznej Anglii pracę tę wykonywali nawet czteroletni chłopcy, którzy przeciskali się przez wąskie kominy domów i fabryk. W 1997 roku w okolicach Reims we Francji powstał pierwszy szpital onkologiczny – oczywiście w odpowiedniej odległości od miasta, którego mieszkańcy obawiali się, że rak jest chorobą zakaźną.

Podstawy nowoczesnej wiedzy na temat raka jako choroby komórek stworzył w połowie XIX wieku urodzony w wiejskiej rodzinie niemiecki lekarz Rudolf Virchow, który zdobył wykształcenie w dziedzinie medycyny i chemii dzięki stypendium w Pruskiej Akademii Wojskowej. Virchow, często nazywany ojcem współczesnej patologii, bardziej niż losem pacjentów interesował się przyczynami ich cierpienia – mechanizmami choroby – i wolał spędzać czas w laboratorium, patrząc w mikroskop i wykonując eksperymenty na zwierzętach, niż odwiedzać chorych. Teoria, że żywe komórki powstają z innych, w wyniku podziału, znana była od dziesięcioleci, ale powszechnie ją odrzucano, zapewne z powodu religijnych przekonań odnoszących się do aktu stworzenia – w tamtych czasach ludzie naprawdę wierzyli, że robaki pojawiały się w zepsutym mięsie samoczynnie.

Dopiero kiedy pewny siebie i niezależny Virchow, aktywny i zaangażowany politycznie naukowiec i lekarz, opublikował swoje obserwacje na temat podziału komórek i ukuł powiedzenie *omnis cellula e cellua* – czyli „wszelka komórka pochodzi od innej komórki" w nieustającym procesie życia – idea ostatecznie się przyjęła. Rozwój biologii molekularnej w połowie XX wieku

pozwolił naukowcom spojrzeć w głąb komórki, by zbadać mechanizmy życia ukryte w DNA i rozpocząć łamanie kodu raka.

ROZDZIAŁ 2

Wewnętrzny wróg

...w którym przeczytacie o:
a) wywołującym nowotwory u drobiu wirusie, który może zostać przekazany przez DNA również innym gatunkom ptaków,
b) odkryciu pierwszych genów odpowiedzialnych za wywołanie nowotworu, tzw. onkogenów.

* * *

Teraz pojawiły się ambitniejsze pytania... Czy może być tak, że wszystkie nowotwory są wynikiem nieprawidłowego funkcjonowania genów? Czy całą złożoność ludzkiego raka można zredukować do chemicznego słownika DNA?

Michael Bishop[6]

Najnowocześniejszą ideą w badaniach połowy XX wieku – niewiarygodnie wówczas kontrowersyjna ze względu na brak jakichkolwiek dowodów – była ta, że nowotwory u ludzi mogą wywoływać wirusy. Najważniejszą dla tej koncepcji postacią był Peyton Rous, urodzony prawie sto lat wcześniej w Teksasie absolwent medycyny na Uniwersytecie Johnsa Hopkinsa w Baltimore, który był bliski zakończenia kariery naukowej zanim na dobre ją zaczął. Jeszcze w czasie studiów Rous zaraził się

gruźlicą podczas sekcji zwłok, kiedy skaleczonym palcem dotknął zainfekowanej kości. Musiał przejść operację usunięcia zakażonych węzłów chłonnych i został odesłany do domu, by wrócić do pełni zdrowia na łonie natury w rodzinnym Teksasie. Rok, który spędził na ranczu, zaganiając bydło i nocując pod gołym niebem razem z innymi kowbojami – niezapomniane doświadczenie, którego wspomnienie towarzyszyło mu do końca życia – pozwolił Rousowi odzyskać siły i powrócić do Johns Hopkins Medical School. Rous zdobył dyplom w 1905 roku, ale już podczas pierwszego roku stażu zorientował się, podobnie jak Virchow, że nie ma predyspozycji do opiekowania się chorym. Wycofał się z pierwszej linii frontu do laboratorium patologicznego, by prowadzić badania nad chorobami. W 1909 roku objął stanowisko szefa laboratorium prowadzącego badania nad nowotworami w Rockefeller Institute of Medical Research. Zastąpił na nim dyrektora instytutu, Simona Flexnera, który postanowił zająć się pilniejszym jego zdaniem problemem, którym było wówczas polio – przyczyna kalectwa milionów amerykańskich dzieci.

Analizując historię badań nad nowotworami możemy wyraźnie dostrzec pewną prawidłowość: niemal wszystko, co wiemy dziś o raku – jako chorobie komórek i genów – pojawiało się jako koncepcja na długo przed tym, zanim naukowcy mieli możliwość zweryfikowania jej. Zwykle zapominamy o tych, którzy jako pierwsi proponowali dany pomysł, pamiętając raczej o tych, którzy go potwierdzali i ogłaszali światu, gdy ten był już na to gotowy. W 1909 roku bardzo niewiele było wiadomo o naturze nowotworów i w zasadzie nie istniały inne metody leczenia niż zabiegi chirurgiczne oraz niezbyt jeszcze popularne naświetlania promieniami rentgenowskimi. Większa część badań

koncentrowała się na rozwijaniu zgłoszonych przez Johna Hilla czy Percivalla Potta hipotez o wpływie czynników chemicznych na powstawanie nowotworów i identyfikowaniu takich karcynogenów.

Rous jednak postanowił zająć się inną kwestią – chciał się dowiedzieć, czy przyczyną złośliwych nowotworów mogą być wirusy. Trudno sobie wyobrazić trudniejsze pytanie, ponieważ w tamtym czasie wirusy były raczej zagadnieniem teoretycznym niż rzeczywistością, a naukowcy znali tak naprawdę tylko pozostawiane przez nie ślady. Wirusy „odkryto" dopiero w latach 90. XIX wieku, kiedy badacze analizujący rozmaite czynniki zakaźne stworzyli filtry umożliwiające zablokowanie przepływu bakterii. Kiedy zauważyli, że przefiltrowany roztwór, z którego usunięto wszystkie znane wówczas patogeny, był nadal zakaźny, popadli w zakłopotanie. Uznali, że źródło tej infekcji musi być czynnikiem chemicznym. A potem nazwali je łacińskim słowem oznaczającym truciznę – *virus*. W okresie, w którym Rous zaczął poszukiwać odpowiedzi na swoje pytanie, w większym lub mniejszym stopniu świat nauki akceptował koncepcję istnienia organizmów zwanych wirusami, a kilka z tych, które wywoływały choroby roślin, zostało już nawet rozpoznanych. Wirusów nadal nie dało się jednak zobaczyć, połączyć w kultury ani złapać w żadne filtry. Można było je zidentyfikować jako czynniki zakaźne tylko metodą wyłączenia – dopiero po tym, kiedy inne, większe patogeny zostały złapane w sieć[7]. W 1908 roku wykryto wirusa wywołującego białaczkę u kur, jednak odkrycie to nie spowodowało poruszenia wśród badaczy nowotworów, ponieważ w tamtym okresie nie uważano białaczki za chorobę złośliwą. Rous był jednak zaintrygowany i w swoich poszukiwaniach wirusów wywołujących raka skoncentrował się

właśnie na drobiu. Bardzo szybko dokonał pierwszego odkrycia. W 1910 roku wykrył u kur mięsaka – nowotwór tkanki łącznej. Można nim było zarazić zdrowe ptaki, wszczepiając im przefiltrowany wyciąg z guza pobrany od chorego osobnika. Po pewnym czasie w ciele zainfekowanego kurczaka tworzył się guz dokładnie tego samego typu co oryginał. Co więcej, eksperyment dawał takie same wyniki za każdym razem i Rous był przekonany, że potrafi wykryć oznaki wirusa w komórkach nowotworowych.

Rous opublikował wyniki swoich badań w 1911 roku, jednak zostały one powszechnie i zdecydowanie odrzucone, jak opowiadał później publiczności zgromadzonej w gmachu Akademii Szwedzkiej, gdy odbierał Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny w 1966 roku. „Wielu badaczy próbowało już wcześniej odnaleźć ślady zewnętrznych przyczyn guzów przeszczepianych myszom lub szczurom, ale pobrane komórki dobrze strzegły swoich sekretów. Dlatego moje obserwacje dotyczące mięsaka przyjęto z takim niedowierzaniem". Było tak, mimo że eksperymenty na drobiu zostały powtórzone kilkukrotnie i że za każdym razem udało się znaleźć wirusa. „Dopiero po 15 latach sporów wśród onkologów uznano ostatecznie moje odkrycie za prawdziwe, z zastrzeżeniem jednak, że nie dotyczy ono ssaków, ponieważ w ich przypadku nie udało się potwierdzić żadnego wirusa".

Odkrycie Rousa miało zapoczątkować rozwój jednej z najbardziej interesujących i przynoszących najwięcej owoców dziedzin badań nad nowotworami. Sam Rous zmarł jednak w 1970 roku, zbyt wcześnie, by zobaczyć efekty swojej pracy. „Nowotwory to jedne z najbardziej niezwykłych ludzkich chorób, o namacalnych objawach, a jednak pomimo ponad 70 lat

nieprzerwanych badań i eksperymentów nadal wiemy o nich bardzo niewiele" – mówił swoim słuchaczom w Akademii, dodając chwilę później: „Zbuntowane komórki nazywamy nowotworowymi, ponieważ tworzą nową tkankę, a utworzoną przez nie narośl nazywamy nowotworem. Kiedy jednak próbujemy odnaleźć te terminy w słownikach medycznych, licząc, że znajdziemy tam więcej informacji, dowiadujemy się, że nowotworowy oznacza «odnoszący się do nowotworu», zaś nowotwór to «guz zbudowany z komórek nowotworowych». Doprawdy trudno o bardziej jaskrawy dowód braku wiedzy".

Po kilku nieudanych próbach uzyskania u myszy i szczurów takich samych rezultatów [jak w przypadku kur], Rous zaniechał badań nad wirusami, poświęcając się dającej dużo więcej satysfakcji dziedzinie patologii. Odkrycie sposobu, w jaki wirus mięsaka Rousa (ang. *Rous sarcoma virus*, RSV) sprawia, że komórki stają się złośliwe, przypadło innym badaczom. Oni również nauczyli się wyciągać z tych odkryć wnioski, które pozwoliły lepiej poznać i zrozumieć mechanikę nowotworów u ludzi.

CHOROBA GENÓW?

Wśród kontynuatorów badań Rousa warto wymienić Michaela Bishopa i Harolda Varmusa, którzy, pracując wspólnie na Uniwersytecie Kalifornijskim w San Francisco, na początku lat 70. XX wieku dokonali tak doniosłych odkryć związanych z RSV, że w 1989 roku również otrzymali za nie Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny. Bishop rozpoczął prace nad wirusem w roku 1968, zaledwie dwa lata po przyznaniu Nobla Rousowi i wspomina, że tamto wydarzenie „uświadamiało, jak

wielką tajemnicą jest związek między RSV i rakiem. Rozwiązanie tej tajemnicy leżało w genetyce".

Tego samego zdania był Varmus, który wówczas odbywał podyplomowy kurs z zakresu badań medycznych na drugim krańcu kraju, w Narodowych Instytutach Zdrowia w Bethesdzie, w stanie Maryland. Varmus był przekonany, że badanie prostych organizmów może znacznie ułatwić poznanie i zrozumienie niezwykle złożonych problemów ludzkiej genetyki – a zwłaszcza jej związków z nowotworami. „Dzięki kilku pouczającym lekturom, które przeczytałem na początku lat 60., wiedziałem wystarczająco dużo na temat wirusów oraz ich związku z nowotworami u zwierząt, by zdawać sobie sprawę, że mogą one zapewnić stosunkowo łatwy dostęp do tak złożonego problemu jak rak" – napisał Varmus w publikacji na temat swojej pracy. „Tak naprawdę dla każdego, kto interesował się genetycznymi podstawami raka, badanie wirusów wydawało się jedyną opcją". Te mikroskopijne organizmy mają od kilku do dziesięciu genów w porównaniu z ponad 20,5 tys. genów znajdujących się w naszych komórkach.

Latem 1969 roku Varmus wraz z żoną Connie postanowili połączyć turystyczny wyjazd do Kalifornii z poszukiwaniem możliwości prowadzenia na Zachodnim Wybrzeżu badań nad wirusami. Podczas spotkania z Mike'em Bishopem w jego laboratorium na Uniwersytecie Kalifornijskim w San Francisco Varmus odkrył w nim bratnią duszę, miłośnika książek o wyrafinowanym guście literackim, który sam próbuje swoich sił jako autor. Bishop również nie był przekonany do tego, czy chce zostać lekarzem. Niemal przypadkiem jednak odkrył w sobie zamiłowanie do badań laboratoryjnych i wybrał tę właśnie dziedzinę. Bardzo szybko znaleźli wspólny język i Varmus zgodził

się dołączyć do Bishopa w następnym roku. „Przyjazd Harolda zmienił moje życie i karierę" – wspominał Bishop w swoim noblowskim przemówieniu. „Bardzo szybko staliśmy się równorzędnym partnerami, a wyniki naszych wspólnych badań były z pewnością lepsze niż suma wyników badań, które każdy z nas prowadziłby osobno".

Kiedy Bishop i Varmus zaczynali wspólną pracę, byli nieco osamotnieni. W 1970 roku większość ich kolegów nadal sceptycznie, czy nawet zdecydowanie negatywnie, podchodziła do teorii, że rak to choroba genetyczna, ponieważ ciągle nie było na to jednoznacznych dowodów. Jednak latem tamtego roku na Gordon Conference, pojawił się pewien młody doktorant z Kalifornii, Steve Martin. Było to doroczne spotkanie czołowych naukowców z rozmaitych dziedzin, których celem było poszukiwanie nowych pomysłów i rozwiązań w toku długich otwartych debat prowadzonych w nieformalnej scenerii starego internatu w Tilton w stanie New Hampshire. Tematem tamtej konferencji były zwierzęce komórki i wirusy, Martin zaś, według opisu Varmusa „oczytany młody człowiek o twarzy cherubina, z ciemnymi lokami i entuzjastycznym podejściem", przyjechał, żeby powiedzieć swoim kolegom, że zdołał wyizolować gen wirusa RSV odpowiedzialny za zezłośliwienie zainfekowanych komórek i wyjaśnić, w jaki sposób tego dokonał. Gen – niedługo później nazwany Src (czyt. „sark") od typu wywoływanego nowotworu – był pierwszym przykładem tego, co później stało się znane jako „onkogeny".

Nazwane od greckiego słowa *onkos* oznaczającego „masę", stanowiące grupę genów odpowiedzialnych za przemianę normalnych komórek w komórki nowotworowe, onkogeny są centralnym elementem opowieści o p53. Osiągnięciem, które

zapewniło Bishopowi i Varmusowi Nagrodę Nobla, było dokonane w 1974 roku odkrycie, że normalne komórki u niezarażonych kurcząt mają kopię genu niemal identycznego jak Src wykryty w wirusie. Co więcej, obaj naukowcy niedługo później odkryli, że również inne gatunki ptaków – m.in. kaczki, indyki, przepiórki, a nawet emu z zoo w Sacramento – mają ten gen. W późniejszym czasie ten podobny do Src gen wykryto także u muszek owocowych, dżdżownic oraz różnych gatunków ssaków, co wskazywało, że jego historia sięga początków ewolucji, a zatem musi on odgrywać w komórce niezwykle istotną rolę.

Jednak w 1974 roku dowody zgromadzone podczas badań rożnych gatunków ptaków wystarczyły Bishopowi, Varmusowi oraz ich współpracownikom do sformułowania rewolucyjnej teorii mówiącej, że wirus tak naprawdę nie był nosicielem obcego genu, który uszkadza komórki żywiciela, lecz raczej, że w toku ewolucji wychwycił ten gen od gospodarza i włączył go do swojego genomu. Proces ten sprawił, że gen stał się niebezpieczny dla pierwotnego ptasiego gospodarza. Naukowcy zaczęli dalej spekulować, że być może w normalnych komórkach zwierzęcych istnieją również inne geny – może nawet wiele – które mogą stać się onkogenami, jeśli zostaną wychwycone i rozniesione przez wirusy.

CZY TWORZYMY MONSTRA JAK FRANKENSTEIN?

Poszukiwanie odpowiedzi, które pozwoliłyby odpowiedzieć na to pytanie wymagało w tamtym czasie nadzwyczaj wielkiego wysiłku, zwłaszcza biorąc pod uwagę dostępne narzędzia – a ograniczeniom technicznym towarzyszyła atmosfera niepokoju

oraz wątpliwości etycznych wśród naukowców. Inżynieria genetyczna była ciągle w powijakach. Za jej początek można przyjąć prowadzone w latach 60. badania nad typami wirusów, które nie atakowały niczego poza bakteriami. Naukowcy odkryli, że te wirusy – nazywane „bakteriofagami" (lub w skrócie po prostu „fagami") – mają zwyczaj pobierania genów od jednej bakterii, którą zainfekowały i przenoszenia ich do kolejnych ofiar. Badacze zaczęli wykorzystywać tę cechę do analizy zachowań genów także w innych typach organizmów.

Rodzajem bakterii najczęściej wykorzystywanym w eksperymentach były *Escherichia coli* (pałeczka okrężnicy, E. coli), ponieważ są mocne, łatwo przyjmują nowe geny, błyskawicznie się rozmnażają i dzięki temu szybko dają wyniki. Jednak wraz z rozwojem technologii, kiedy naukowcy opanowali sztukę łączenia genów – tworzenia „rekombinowanego DNA" poprzez wycinanie kawałków DNA z jednego genomu i dołączanie ich do innego – niektórzy z nich zaczęli odczuwać niepokój.

Badacze zajmowali się już nie tylko bakteriofagami, ale także wirusami zwierzęcymi. Poza tym, zgodnie ze zwyczajem, laboratoria z różnych krajów dzieliły się ze sobą stworzonymi hybrydami, w związku z czym nowe organizmy zaczęły rozprzestrzeniać się po całym świecie. Czy jednak dociekliwi naukowcy – skoncentrowani wyłącznie na odkrywaniu tajemnic komórek – nie podejmowali zbyt wielkiego ryzyka, wkraczając na nieznane terytorium? O ile bowiem jedni widzieli w tym przede wszystkim możliwości tworzenia nowych narzędzi genetycznych, które pozwoliłyby skuteczniej leczyć choroby czy zapewniać wyższe plony, o tyle inni obawiali się potencjalnej katastrofy, jak zauważał M.J. Peterson w opisie przypadku dla

Science, Technology and Society Initiative na Uniwersytecie Massachusetts. „Uznawali, że ryzyko przypadkowego powstania niebezpiecznych organizmów – złośliwych «super» wersji chorobotwórczych bakterii lub wirusów, nieznanych i inwazyjnych form życia, które będą wypychać inne z ich naturalnych środowisk – wynikające z braku dostatecznej wiedzy na temat interakcji między genami i sekwencjami genów, było zbyt wielkie, by je ignorować".

Naukowcy wykorzystywali w swoich badaniach najczęściej szczep bakterii E. coli znany jako K12. Wyewoluował on do postaci, w której nie mógł żyć poza kulturami komórkowymi w laboratoryjnych probówkach lub na szalkach Petriego. Istniała jednak obawa, że jeśli K12 kiedykolwiek wydostanie się z laboratorium, może się połączyć z innymi szczepami E. coli, która jest bakterią powszechnie występującą w naturze, zazwyczaj żyjącą w harmonii z człowiekiem i innymi zwierzętami. Możliwość otwarcia nowej puszki Pandory najbardziej niepokoiła mikrobiologów. Obawiali się oni, że badacze bez specjalistycznego przeszkolenia w zakresie zwyczajów życiowych u drobnoustrojów – a w grupie naukowców chętnie wykorzystujących nowe narzędzia było takich wielu – nie są w stanie właściwie ocenić ryzyka. Często zdarzało się, że wylewali do kanalizacji odpady organiczne pozostałe po zakończonych doświadczeniach lub też sami zasysali badany roztwór do pipety. Jak nieco później podkreślali ich krytycy w raporcie na temat możliwych zagrożeń, „mikroorganizm to coś więcej niż tylko «ogrzewany pojemnik» służący do przechowywania interesujących nas cząsteczek rekombinowanego DNA". W 1974 roku wielu naukowców zaprzestało prac nad rekombinowanym

DNA w oczekiwaniu na formalną debatę na temat wykorzystania tej technologii w przyszłości.

Gorąca dyskusja rozpoczęła się rok później, zarówno w środowisku samych naukowców, jak i w światowych mediach branżowych. Jej punktem kulminacyjnym była międzynarodowa konferencja zwołana w Asilomar Center, wspaniałym starym budynku nad brzegiem Pacyfiku w okolicach Monterey w Kalifornii, zbudowanym z miejscowego drewna i kamienia. W swoim artykule dla magazynu „Science", napisanym z okazji 25. rocznicy tej konferencji, Marcia Barinaga określiła ją jako „Woodstock biologii molekularnej – decydujący moment dla całego pokolenia, niezapomniane doświadczenie, kamień milowy w historii nauki i społeczeństwa". Z kolei David Baltimore, laureat Nagrody Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny z 1975 roku za osiągnięcia w badaniach nad wirusami, a zarazem jeden z organizatorów konferencji, wspomina tamte czasy słowami: „Rekombinacja DNA dawała nam nieograniczone możliwości. Kiedy dowiedzieliśmy się, że to możliwe, mieliśmy wrażenie, że jesteśmy wszechmocni".

Rzeczywiście, problem okazał się tak ekscytujący i potencjalnie przerażający, że próba osiągnięcia konsensusu co do dalszych metod postępowania – podjęta przez grupę 133 zgromadzonych w Asilomar naukowców o zróżnicowanych poglądach, którzy obradowali pod czujnym okiem 16 dziennikarzy i 4 prawników – okazała się niezwykle trudna. Ostatecznie proces udrożniła decyzja, by podzielić doświadczenia z wykorzystaniem rekombinowanego DNA na kilka kategorii – w zależności od tego, czy obejmowały one organizmy lub fragmenty DNA znane jako potencjalnie groźne lub chorobotwórcze, czy też materiały uznawane za nieszkodliwe – i zaproponować rekomendacje dla

rozmaitych sytuacji. Wśród zaleceń było na przykład wdrażanie rozwiązań umożliwiających rozbrojenie wykorzystywanych w doświadczeniach organizmów w taki sposób, by nie mogły się krzyżować ani przeżyć poza kulturami laboratoryjnymi, a także wprowadzanie określonych środków bezpieczeństwa w samych laboratoriach. W niedługim czasie rządy poszczególnych krajów przekształciły rekomendacje Konferencji w Asilomar w użyteczne wytyczne i w 1976 roku naukowcy mogli powrócić do swoich badań z wykorzystaniem rekombinowanego DNA, mniej lub bardziej pewni, że nie wypuszczą w świat monstrów doktora Frankensteina.

W JAKI SPOSÓB ONKOGENY STAJĄ SIĘ ZŁOŚLIWE

Pytanie, które nie dawało spokoju naukowcom od czasu odkrycia przez Bishopa i Varmusa onkogenu Src u drobiu i innych ptaków, brzmiało: czy te onkogeny komórkowe mogą wywołać nowotwory, nawet jeśli nie zostaną wychwycone przez wirusa? Niedługo później okazało się, że w rzeczy samej, mogą. Pierwsze dowody na to pochodziły z laboratoriów, w tym również z pracowni Bishopa i Varmusa, badających działanie wirusów, które atakują zwierzęta i wywołują nowotwory, ale nie mają w składzie onkogenów. Badacze odkryli, że wirusy te „uderzają" w DNA komórki gospodarza, uszkadzają zawarte w nim informacje i zakłócają funkcjonowanie mechanizmu wzrostu i naprawy [komórek], wprowadzając do nich program nowotworowy.

Kolejne dowody odkryli pracownicy laboratorium Boba Weinberga w MIT, którzy nie badali roli wirusów, lecz wpływ

czynników chemicznych na zrakowacenie komórek. Weinberg był zaintrygowany pracami Bishopa i Varmusa i pod ich wpływem zaczął się zastanawiać, czy karcynogeny chemiczne działają w taki sam sposób – uszkadzając potencjalne onkogeny (tzw. „protoonkogeny") i wywołując ich mutację. W tamtym okresie, chociaż koncepcja zakładająca udział zmutowanych genów w powstawaniu nowotworów była już znana od pewnego czasu, nadal brakowało twardych dowodów i przekonujących testów, więc wielu naukowców podchodziło do niej sceptycznie. Sam Weinberg ciągle nie był do niej przekonany.

Chcąc zweryfikować prawdziwość tej teorii, członkowie zespołu Weinberga pobrali komórki myszy i zadziałali na nie czynnikami chemicznymi, by spowodować zrakowacenie. Następnie wyodrębnili czyste DNA z tych komórek i dodali je do zdrowych mysich komórek znajdujących się w szalkach Petriego w laboratorium. Oczywiście, zdrowe komórki również uległy mutacji, potwierdzając, że czynnik, który spowodował zmiany został przeniesiony w DNA, w genach, choć nie dało się jednoznacznie stwierdzić, które dokładnie geny były za to odpowiedzialne. Był to pierwszy dowód na potwierdzenie, iż potencjalne onkogeny nie potrzebują działania wirusów, by ulec mutacji i że czynniki chemiczne mogą wywołać taki sam efekt.

Jednakże osiągnięcie zespołu Weinberga zostało w pewien sposób przyćmione przez skandal wywołany przez pewnego naukowca z Kanady, który prowadził podobne badania. „Zaproszono go, żeby poprowadził seminarium na Harvardzie" – opowiadał później swoim słuchaczom w MIT Weinberg. „Brałem udział w tym seminarium i słuchając go, czułem równocześnie ogromny entuzjazm i przygnębienie. Prace, które prezentował

były tak rozległe, że wykraczały daleko poza możliwości mojego laboratorium. To były fantastyczne dane, które wskazywały, że ten facet osiągnął więcej, niż nasza pracownia była w stanie osiągnąć w ciągu kolejnych 10 lub 20 lat – zebrał po prostu ogromne ilości danych! Kiedy skończył, podszedłem do niego i powiedziałem: «Wie pan, my w naszym laboratorium zaczynamy osiągać takie same rezultaty!». A on zapytał: «Naprawdę?». Był bardzo podekscytowany".

„Powiem wam, że zazwyczaj, kiedy ktoś podchodzi do was po wykładzie i mówi, że jego wyniki są takie same jak wasze, wywołuje to mieszane uczucia" – kontynuował Weinberg. „Z jednej strony to bardzo miłe, kiedy ktoś potwierdza wasze odkrycia, ale z drugiej powoduje to, że zaczynacie czuć na plecach oddech konkurencji!". Przy tych słowach słuchacze zachichotali. „Tymczasem jemu wyraźnie sprawiło to przyjemność – co podświadomie odnotowałem, ale szybko o tym zapomniałem".

Jak się okazało, osiągnięcia kanadyjskiego naukowca zrobiły wrażenie na wielu osobach, ponieważ niedługo później poproszono go o podobne wykłady w MIT Cancer Centre, Cold Spring Harbor oraz innych prestiżowych amerykańskich centrach badawczych. „Jednak tuż przed jego przyjazdem, David Baltimore wpadł do mojego gabinetu, krzycząc: «Nie uwierzysz, co się stało... szef tego faceta z Toronto właśnie wyrzucił go ze swojego laboratorium!». «Co takiego?», zapytałem. Odpowiedział: «A tak, wysłali artykuł do recenzji w 'Cell' i jeden z recenzentów policzył, ile szalek Petriego trzeba by zużyć, że wykonać całą tę pracę. Obliczył, że trzeba by ich więcej, niż zużyto w tamtym roku w całej wschodniej Kanadzie!»" – mówił dalej Weinberg. Następnie zrobił minę wyrażającą niedowierzanie i cała publiczność wybuchnęła śmiechem. „I tak się okazało – choć facet

do dziś nie przyznał się, że zrobił coś złego – że jego koncepcje może i były trafione, jednak dane, które publikował, pochodziły raczej z jego głowy, niż z laboratorium...".

W rezultacie tej nieuczciwości przez następne 10 lat centra badawcze takie jak laboratorium Weinberga miały ogromne problemy z uzyskaniem akceptacji środowiska naukowego dla wyników ich badań. Obawiano się kolejnych oszustw. Kiedy jednak dowody dotyczące onkogenów zaczęły spływać z różnych laboratoriów, wątpliwości zaczęły stopniowo się rozwiewać. Społeczność badaczy skupiła się na „akceleracyjnym" modelu raka – takim, w którym prawidłowy mechanizm podziału komórek zostaje aktywnie przeprogramowany przez „zbuntowane" geny i dochodzi do niekontrolowanej proliferacji komórek. Taki właśnie sposób myślenia był powszechny, kiedy w 1979 roku odkryto białko p53.

ROZDZIAŁ 3

Odkrycie

...w którym:
a) poznamy naukowców, którzy natknęli się na p53 podczas badania onkogenów w małpich wirusach,
b) dowiemy się, że za każdym razem, gdy próbowali oni oczyścić białko wytwarzane przez onkogeny, znajdowali w probówkach inne białko, którego nie mogli się pozbyć.

* * *

Kiedy tkwimy w ciemnej jaskini niewiedzy, po omacku próbując wyczuć zarys skalnych ścian i nachylenie podłogi, wsłuchując się w echo własnych kroków, odtrącając fałszywe podpowiedzi snujące się wokół jak pajęczyny, wcale nie mamy pewności, że właśnie dokonujemy jakiegoś ważnego odkrycia.

Horace Freeland Judson[8]

Historia nauki pełna jest doniosłych odkryć, których znaczenie doceniamy dopiero po czasie. Sam moment przełomu zazwyczaj pozbawiony jest dramaturgii, czy choćby jakichś szczególnych znaków. Życie toczy się dalej. Okoliczności są zwykle podobne: jakieś zaniedbane laboratorium, probówki porozstawiane między rozrzuconymi dokumentami, zapiskami i zdjęciami

mikroskopowymi, rodzinne zdjęcia na biurkach i pocztówki z wakacji przypięte na korkowych tablicach, a także fartuchy przerzucone przez oparcia obrotowych krzeseł. Tak właśnie było, gdy w 1979 roku odkryto p53.

Doszło zresztą do tego niezależnie w czterech miejscach, niemal dokładnie w tym samym czasie: w laboratoriach w Londynie, Paryżu, New Jersey i Nowym Jorku. Główne zasługi przypisuje się jednak dwóm badaczom, Davidowi Lane'owi oraz Arniemu Levine'owi, którzy opublikowali wyniki swoich prac w najbardziej prestiżowych czasopismach, w „Nature" i w „Cell".

Obaj naukowcy prowadzili prace w nieco kontrowersyjnej wówczas dziedzinie onkogenów – Lane w Imperial Cancer Research Fund w Londynie a Levine na Uniwersytecie Princeton w New Jersey. Po przeczytaniu suchych opisów ich odkryć, na jakie natknąć się można w literaturze naukowej, postanowiłam spotkać się z nimi osobiście, by poznać ich historie z pierwszej ręki. Zanim je przytoczę, chciałabym najpierw w skrócie przedstawić układ doświadczalny, jaki wykorzystywali, jako że sam w sobie wiązał się z barwną historią. Naukowcy przyglądali się wirusowi SV40, czyli małpiemu wirusowi wakuolizującemu[9] nr 40, powszechnie wykorzystywanemu w biologii molekularnej. SV40 jest „koniem pociągowym" biologii molekularnej, ponieważ stanowi podstawę prostego modelu umożliwiającego badanie funkcjonowania mechanizmów komórkowych – DNA, genów oraz białek – w złożonych organizmach, włączając w to ludzi.

Jak wskazuje jego nazwa, SV40 atakuje pewne gatunki małp, choć nie zawsze wywołuje u nich choroby. Wirus został odkryty w 1960 roku przez amerykańskiego mikrobiologa Maurice'a Hillemana jako składnik zanieczyszczający szczepionki przeciw

polio. Oryginalne szczepionki stworzone przez Salka i Sabina zawierały, będące znakomitą pożywką dla rozwoju wirusów polio, komórki nerek makaków królewskich, małp z gatunku żyjących w dżunglach i na równinach Azji. Wirus rozmnażający się w tych komórkach był uzyskiwany i modyfikowany w taki sposób, że przestawał być szkodliwy, za to wywoływał odpowiednią reakcję systemu odpornościowego u zaszczepionej osoby, zapewniającą ochronę w przypadku potencjalnego kontaktu ze szkodliwym wirusem polio. Hilleman, pracownik Merck Pharmaceutical Company, znany w firmie z ognistego temperamentu i kolekcji „odciętych głów" (modeli zwolnionych za niewypełnianie rygorystycznych wymagań pracowników – autorstwa jednego z jego dzieci), które stały w jego biurze, był jednym z pionierów badań nad szczepionkami. W swej karierze stworzył ponad 40 szczepionek, m.in. przeciwko śwince i odrze. Hilleman ostrzegał, że małpie komórki wykorzystywane do rozmnażania wirusa polio mogą zawierać również inne, nieznane wirusy i pięć lat po pierwszej masowej kampanii szczepień przeciw tej wywołującej paraliż chorobie, razem ze swym współpracownikiem Benjaminem Sweetem udowodnił, iż rzeczywiście tak jest.

Zanim wykryto ów groźny wirus hodowany wraz z wirusem polio, szczepieniom poddano miliony ludzi na całym świecie. Nikt nadmiernie się tym nie martwił aż do kolejnego roku, kiedy to pojawił się raport ujawniający, że po wszczepieniu wirusa SV40 u nowo narodzonych chomików zaczynają się rozwijać guzy nowotworowe. Rząd amerykański nakazał zbadanie wszystkich nowych partii szczepionek przeciw polio i usunięcie z nich SV40. Nie wycofano jednak z rynku wprowadzonych wcześniej partii i do czasu ich wyczerpania w 1963 roku od 10 do 30 mln

Amerykanów, a także niezliczonej liczbie ludzi na całym świecie, wstrzyknięto zanieczyszczone szczepionki (te, które podawano doustnie, nie stanowiły zagrożenia). Jednak pomimo szczegółowych, trwających ponad pół wieku badań i dochodzeń prowadzonych w Stanach Zjednoczonych i Europie – i wykrycia śladów SV40 w niektórych rzadkich nowotworach mózgu, kości oraz płuc – najważniejsze instytucje nadzorujące służbę zdrowia, takie jak Centers for Disease Control and Prevention czy amerykański Narodowy Instytut ds. Raka zapewniają, że nie ma żadnych dowodów na zwiększone ryzyko wystąpienia nowotworu u osób, które mogły otrzymać zanieczyszczoną szczepionkę przeciw polio. Instytucje te twierdzą również, że nie ma żadnych dowodów, iż małpi wirus zidentyfikowany w występujących rzadko nowotworach był ich przyczyną – choć podejrzeń, że tak właśnie było, prawdopodobnie nigdy nie uda się ostatecznie rozwiać.

DŁUGA DROGA DO ODKRYCIA TAJEMNICY

Dla Davida Lane'a, który rozpoczął prace nad SV40 w połowie lat 70. ubiegłego wieku, była to zupełnie nowa dziedzina. Ten absolwent immunologii University College w Londynie przygotowywał się właśnie do napisania doktoratu pod kierunkiem charyzmatycznego profesora Avriona Mitchisona, kiedy otrzymał propozycję pracy w laboratorium badawczym prowadzonym przez Lionela Crawforda w Imperial Cancer Research Fund (ICRF). Oprócz ekscytacji związanej z nowym wyzwaniem intelektualnym, uczestnictwo w badaniach nad nowotworem miało dla Lane'a także znaczenie emocjonalne. Kiedy studiował, jego ojciec zmarł na raka odbytnicy w ciągu

sześciu miesięcy od pojawienia się bólów w dole pleców. Zostawił wciąż jeszcze młodą żonę i pięcioro dzieci, zupełnie nieprzygotowanych na taką stratę. „To trwało bardzo krótko i wszyscy byliśmy zszokowani" – wspomina Lane, kiedy siedzimy przy kawie w oświetlonej wrześniowym słońcem oranżerii w jego domu w Szkocji, słuchając ryku silników odrzutowców startujących z pobliskiej bazy wojskowej w Leuchars. Lane opowiada, jak opiekował się ojcem w ostatnim okresie jego życia. „Widziałem, jaki wpływ na ludzi ma ta choroba i było to doświadczenie, które mnie ukształtowało. Odczułem to bardzo mocno – cała moja rodzina również".

Jako immunolog Lane nauczył się wykorzystywać izotopy jodu do oznaczania białek w komórkach tak, aby można było je obserwować podczas doświadczeń, a w laboratorium Crawforda w ICRF poszukiwano ludzi z takimi umiejętnościami. „Zastosowanie izotopów sprawia, że białka stają się radioaktywne i dają się błyskawicznie wykryć" – wyjaśnia. „Byłem w tym dobry. Robiłem to pracując nad doktoratem. Nie wszyscy chcieli mieć z tym do czynienia. Sądzę, że to całkowicie bezpieczne, jednak dość głośne izotopy. Licznik Geigera robi wyraźne «crrkk!». A ty wiesz, że zrobiłeś, co trzeba"[10].

Fakt, że SV40 może „przekształcić" zdrowe komórki w komórki nowotworowe, a skutki jego działania są drastyczne wystarczył, by uczynić z niego obiekt zainteresowania badaczy w ICRF. Tuż przed rozpoczęciem przez Lane'a pracy w centrum, tamtejsi naukowcy zidentyfikowali gen wirusa odpowiedzialny za transformację SV40, czyli jego onkogen. Nazwali go dużym antygenem T. Chcąc ustalić dokładnie, w jaki sposób wirus przekształca zaatakowane komórki gospodarza, naukowcy musieli zacząć od zbadania białka, które powstaje, kiedy uruchamia się

duży antygen T. Tym właśnie zajmowało się laboratorium Crawforda. Zadaniem Lane'a było przygotowanie odczynników lub narzędzi, które pozwoliłyby odróżnić białko dużego antygenu T i wyekstrahować je z zainfekowanej komórki. Wyzwanie polegało na tym, by uzyskać odpowiednią ilość czystego, pozbawionego wszelkich osadów białka. Odczynnik przygotowany przez Lane'a działał na takiej samej zasadzie jak układ odpornościowy. Opracowane przeciwciała wykrywały duży antygen T dokładnie tak, jak przeciwciała produkowane przez nasze organizmy wyszukują i „wyłapują" agresywne obce cząsteczki, niszczone później przez fagocyty.

„To były niezwykle ekscytujące czasy" – wspomina Lane, bardzo kontaktowy mężczyzna o chłopięcym wyglądzie, pełen entuzjazmu, który każde sądzić, że bez względu na wyzwania, presję czy układy polityczne, nauka jest zawsze dla niego dobrą zabawą. „Czułem, że jesteśmy w samym centrum wydarzeń. Byliśmy w fantastycznym laboratorium w ICRF razem z pionierami tych badań. Jednym z nich był Renato Dulbecco (który zdobył właśnie Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny za swoje badania nad rakotwórczymi wirusami). Pamiętam także, że Harold Varmus spędzał u nas swój urlop naukowy. Praca była jednocześnie wyzwaniem intelektualnym i źródłem nowej wiedzy. [Pamiętam] wiele spotkań i dyskusji, podczas których poddawaliśmy dane krytycznej analizie".

Lane i Crawford zaczęli robić właśnie pierwsze postępy w opracowywaniu odczynników umożliwiających uzyskiwanie oczyszczonego dużego antygenu T, gdy starszy z nich wyjechał na roczny urlop naukowy do Stanów Zjednoczonych, zostawiając faktyczne kierowanie laboratorium młodszemu koledze. Dwudziestokilkuletni Lane został wciągnięty w biurową politykę.

Musiał stawić czoła współpracownikom, którzy próbowali wzmocnić własną pozycję i nadużywali swego autorytetu, mówiąc młodszemu koledze, co ma robić pod nieobecność szefa. Ale Lane nie pozwolił sobą dyrygować. Nie tylko był z natury odporny na tego typu zachowania, lecz w dodatku został ukształtowany przez błyskotliwego, niekonwencjonalnego i całkowicie niezależnego Avriona Mitchisona, siostrzeńca wybitnego brytyjskiego biologa J.B.S. Haldane'a, człowieka, którego filozofia nauczania opierała się na dawaniu studentom pełnej swobody i samodzielności (według opowieści Lane'a, podczas jednego z egzaminów profesor po prostu ustawił na ławce kilka przedmiotów i prosił studentów o uwagi i komentarze na ich temat, testując tym samym ich wyobraźnię, a także zawstydzając wszystkich tych, którzy kuli przed egzaminem). Lata nauki u Mitchisona wzmocniły niezależność Lane'a. W ICRF zignorował zatem próby nacisku ze strony starszych kolegów, którzy nakłaniali go, by zmienił kierunek badań. Zajął się tym, czym chciał.

„Opracowaliśmy naprawdę świetny odczynnik reagujący konkretnie na duży antygen T" – wspomina okres prowadzący do odkrycia p53. „Byliśmy z niego szczególnie dumni, bo robiliśmy wszystko, żeby się upewnić, że będzie skuteczny. Jednak, kiedy go zastosowaliśmy, to zamiast – jak się spodziewaliśmy – wiązać się tylko z wybranym białkiem, przyłączał się także do innego, o masie cząsteczkowej 53 kilodaltonów".

Uzyskiwanie dużego antygenu T odbywało się w procesie nazywanym elektroforezą, polegającym na przepuszczaniu prądu elektrycznego przez umieszczony pomiędzy dwiema szklanymi płytkami żel, do którego dodawana jest mieszanka białek. Prąd

powoduje przemieszczanie się molekuł białka zgodnie z kierunkiem przepływu ładunków, a przez to rozdzielnie różnych ich rodzajów, ponieważ mniejsze molekuły przesuwają się znacznie dalej, niż większe. Jednak w tym wypadku, bez względu na to, jak bardzo Lane próbował, nigdy nie udało mu się wydzielić czystego białka dużego antygenu T – zawsze towarzyszył mu nieustępliwy „cień".

Tym z nas, którzy nie posługują się mikroskopem na co dzień trudno sobie wyobrazić, że można się ekscytować dwiema małymi ciemnymi smugami na powierzchni żelu albo że taki prozaiczny widok może sugerować początek czegoś wiekopomnego. Ale podobnie jak piękno, odkrycie naukowe także jest w oku patrzącego – zależy od tego, czy badacz dostrzega coś wyjątkowego w obrazie, który innym może się wydawać zwyczajny lub nijaki, a także od tego, czy ma wystarczającą wiedzę, by domyślić się, co to może znaczyć. Nasuwa się porównanie ze świata makroskopowego: dla niewprawnego oka ślady stóp z Laetoli byłyby jedynie zwyczajnymi wgłębieniami na dnie dalekiego afrykańskiego kanionu. Tymczasem, dla paleoantropolożki Mary Leakey, która odkryła je w 1976 roku, stały się furtką do badań przeszłości i fascynujących początków rodzaju ludzkiego.

Dlatego właśnie dla Davida Lane'a te dwie małe smugi były bardzo ekscytujące, mimo że na tym etapie nie mógł jeszcze wiedzieć, co naprawdę odkrył. Dopiero po pewnym czasie okazało się, że to p53, nieznany dotąd nikomu nowy typ białka. Na razie koledzy Lane'a z laboratorium nie podzielali jego entuzjazmu, twierdząc, że to zwykłe zanieczyszczenie, że jego narzędzia nie były tak dobre, jak mu się wydawało, albo że „nieposłuszne" białko powstało w wyniku podziału dużego

antygenu T, który został pocięty na kawałeczki w zainfekowanych mysich komórkach wykorzystywanych do doświadczeń. Lane jednak ufał swoim narzędziom: przeciwciałom stworzonym specjalnie do tego, by rozpoznawać i wychwytywać właśnie duży antygen T, a nie jakieś inne białko. Poza tym postępował bardzo ostrożnie, by uniknąć jakichkolwiek zanieczyszczeń w swoich doświadczeniach i dlatego był przekonany, że to, co kilkakrotnie dostrzegł w badanym żelu, było istotne. „W głębi serca byłem przekonany, że to musi mieć coś wspólnego z przekształcaniem komórek przez wirus, ponieważ w pewnym sensie tego oczekiwałem. Czytałem o tym w artykule Joego Sambrooka (szanowanego specjalisty w dziedzinie onkowirusów), który przekonywał, że «duży antygen T nie może działać na wiele różnych sposobów. To przecież proste białko. Przedostaje się do komórki i przekształca ją w komórkę rakową, musi więc wchodzić w interakcje z jakimś elementem mechanizmu gospodarza». I tego właśnie szukałem".

Również w tym przypadku wiedza Lane'a z zakresu immunologii okazała się przydatna, ponieważ podpowiadała mu, że jeśli w zainfekowanej komórce dwa białka są ze sobą fizycznie połączone, to przeciwciało, które rozpoznaje jedno z nich, automatycznie wychwyci również to drugie – które „siedzi na plecach" pierwszego. Wzmocniło to jego przekonanie, że interakcja między oboma elementami ma kluczowe znaczenie dla przekształcania komórek przez duży antygen T. Udało mu się zgromadzić wystarczająco dużo dowodów, by potwierdzić swoją teorię i uruchomić wyobraźnię Crawforda, który po powrocie z urlopu powtórzył eksperymenty młodszego kolegi. Obaj naukowcy opublikowali swoje odkrycia w magazynie „Nature".

Redakcja była pod tak ogromnym wrażeniem, że umieściła temat na okładce numeru z 26 kwietnia 1979 roku.

INNI NA TEJ SAMEJ DRODZE

W tym samym czasie, po drugiej stronie Atlantyku, w otoczonym zacisznym parkiem laboratorium Uniwersytetu Princeton, Arnie Levine również badał małpi wirus SV40, próbując odkryć mechanizmy wywołujące zrakowacenie komórek. „Już od dzieciństwa fascynowały mnie wirusy" – mówi Levine, gdy odwiedzam go w New Jersey. Do kwitnącego, statecznego miasteczka uniwersyteckiego Princeton docieram z [nowojorskiej] Penn Station[11], jadąc przez zaniedbane postindustrialne przedmieścia Nowego Jorku. „Najbardziej poruszał moją wyobraźnię fakt, że od stu lat znaliśmy już efekty działania wirusów, ale ich samych nikt jeszcze nie widział. Są najmniejszymi z istot żywych, o całkowicie zdegenerowanej postaci!"[12].

Levine, dziś przemiły sześćdziesięciokilkulatek, dorastał w Nowym Jorku. Jego ojciec był właścicielem kina i od czasu do czasu młody Arnie dorabiał do kieszonkowego jako woźny i bileter. „Jamesa Cagneya w «Yankee Doodle Dandy» widziałem chyba ze 20 razy" – śmieje się. „Dorastałem w cudownej okolicy na Brooklynie, w typowej amerykańskiej dzielnicy, wśród mieszanki Włochów, Skandynawów i Żydów. Moi dziadkowie pochodzili z Polski i Litwy. Ojciec przyjechał z Litwy jako młody chłopak, ale nigdy nie chodził do szkoły. Poszedł od razu do pracy, tak jak większość imigrantów, ponieważ musiał zarabiać, żeby przeżyć".

Rodzice Levine'a gorąco wierzyli w edukację swoich dzieci, więc młody Arnie został studentem Harpur College (obecnie Uniwersytet Binghamton) w Nowym Jorku, gdzie wykładowcą mikrobiologii była Mildred Shellig, emerytowana lekarz medycyny, która, jak twierdzi Levine, zaraziła go pasją do nauki. „Entuzjazm dr Shellig był zaraźliwy i stało się coś, czego absolutnie się nie spodziewałem – pokochałem pracę w laboratorium. Powtarzaliśmy doświadczenia opisane wcześniej w literaturze, a czasem próbowaliśmy zupełnie nowych eksperymentów. Wszyscy zostawaliśmy w laboratorium do późna w nocy, zapraszała nas też do siebie do domu, gdzie dalej rozmawialiśmy. O czym? Dyskutowaliśmy o nauce! Całkowicie tym przesiąkłem. To było około roku 1959 – niecałe sześć lat po tym, jak Watson i Crick odkryli strukturę DNA. Rewolucja w biologii molekularnej dopiero się rozpędzała".

Levine rozpoczął karierę, badając metody replikacji wirusów, opierające się zazwyczaj na przejmowaniu mechanizmów komórki gospodarza, ponieważ wirusy jako pasożyty nie mogą funkcjonować poza innymi organizmami żywymi, roślinami lub zwierzętami. Levin pracował z bakteriofagami – opisanymi wcześniej wirusami atakującymi bakterie. Stanowią one znakomity materiał, ponieważ w ich przypadku wszystko odbywa się bardzo szybko. Zainfekowana bakteria może wypluć z siebie nową generację wirusa mniej więcej co 20–60 minut, podczas gdy komórce zwierzęcej zajmuje to nawet 48 godzin. Jednak kiedy Levine usłyszał o onkogenach i wirusach wywołujących nowotwory u zwierząt, zmienił swoje zainteresowania. Jego wyobraźnia pracowała na najwyższych obrotach. *Jak to możliwe?* – zastanawiał się, myśląc o tych maleńkich formach życia. *W jaki sposób jeden lub dwa proste elementy genetyczne kodujące*

informacje dla białek mogą wywołać raka? „Wydawało mi się, że po raz pierwszy mamy szansę poznać i zrozumieć proces powstawania nowotworów u człowieka. Dlatego moje działania w tej dziedzinie opierały się na wykorzystywaniu najprostszego systemu do poszukiwania odpowiedzi na jedno z najtrudniejszych pytań. Brzmiało ono: Jakie są początki raka u ludzi?".

Jedna z teorii popularnych w okresie, kiedy Levine odkrył p53 głosiła, że komórki rakowe zostają przeprogramowane tak, by przypominały komórki zarodkowe lub płodowe. Innymi słowy, zegar ewolucyjny cofa się do etapu, w którym naturalnym zachowaniem komórek jest gwałtowny podział, podobnie, jak w rozwijającym się zarodku. Naukowcy znaleźli potwierdzenie tej teorii w postaci regresywnych białek płodowych obecnych w nowotworach wątroby i jelita, a także opracowali badanie krwi pozwalające wykryć przeciwciała wytwarzane przez układ odpornościowy rozpoznający je jako odstępstwo od normy – pojawiające się w niewłaściwym miejscu i czasie – które należy zaatakować i zniszczyć".

Koncepcja „reembrionizacji" komórek była atrakcyjna ze względu na oczywiste podobieństwa w zachowaniu obu typów komórek – zarodkowych i nowotworowych. W wielu laboratoriach rozpoczęło się poszukiwanie białek, które byłyby obecne zarówno w normalnych komórkach zarodków, jak i w komórkach rakowych, ale które nie występowałyby w zdrowych, w pełni rozwiniętych dorosłych komórkach. Nukowcy sądzili, że białka te, chociaż potrzebne, a nawet pożądane dla rozwijających się zarodków, mogły równocześnie być siłą napędową raka. Levine i zespół badaczy poszukiwali dowodów na istnienie białek płodowych pojawiających się

w reakcji na infekcję wirusem SV40. Gdy odkryli p53, byli przekonani, że to właśnie tego typu białko. Daniel Linzer, współpracujący z Levine'em student, który wykonał pierwsze doświadczenia, pokazał mu intrygujące wyniki. Okazało się, że w zainfekowanych komórkach pojawiło się nieznane białko w bardzo dużych ilościach. Sugerowało to, że pełni ono bardzo istotną funkcję i że wchodzi w interakcje z wirusowym onkogenem, dużym antygenem T. Co więcej, członkowie zespołu [badawczego] dokładnie to samo białko wykryli również w niezainfekowanych komórkach płodowych.

Kiedy Levine i Linzer publikowali swój artykuł w „Cell", wiedzieli już z dalszych doświadczeń, że p53 nie jest poszukiwanym przez nich białkiem płodowym. Zresztą cała teoria podobieństwa komórek [płodowych i nowotworowych] zaczęła tracić zwolenników. Jednakże poza stwierdzeniem, że owo [nowe] białko musi być istotne z uwagi choćby na fakt jego regularnej obecności w komórkach nowotworowych, Levine nie wiedział, co zrobić ze swym odkryciem. „To pewne: nie mieliśmy pojęcia, dokąd to wszystko prowadzi. Zwłaszcza, jeśli spojrzeć na to z dzisiejszej perspektywy!" – śmieje się i przerywa na chwilę. „Nie sądzę, by ktokolwiek z nas zdawał sobie wtedy sprawę, że odkryliśmy najważniejszy i najczęściej mutujący w przypadku nowotworów gen... Na pewno jednak byliśmy przekonani, że udało nam się znaleźć drogę do odkrycia, w jaki sposób SV40 wywołuje raka".

GRUPA PARYSKA

W Paryżu, trzecia grupa naukowców, była równie zadziwiona obecnością białka [p53] towarzyszącego dużemu antygenowi T,

gdy odkryto je podczas doświadczeń na SV40. Doszło do tego w laboratorium Pierre'a i Evelyne May w Integrated Cancer Research Institute w Villejuif, gdzie naukowcy badali równolegle SV40 oraz podobny wirus, o nazwie polyoma, wywołujący różne rodzaje guzów u zwierząt. Oprócz dużego antygenu T, jak w SV40, wirus polyoma ma również mały i średni antygen T. Oba te antygeny uczestniczą w transformacji zainfekowanych komórek, a średni antygen T ma szczególny wpływ na powstawanie nowotworów. Większość badaczy przypuszczała, że średni antygen T istnieje również w wirusie SV40. O tym także pomyśleli współpracownicy Maya, kiedy ich kolega, doktorant Michel Kress, znalazł podczas swoich doświadczeń duże ilości nowego białka. Thierry Soussi, który sam odegrał znaczącą rolę w historii i odkrywaniu właściwości p53, pracował wówczas w innym laboratorium, w tym samym budynku co państwo May, analizując replikację SV40. „Pamiętam jak jeden z naszych adiunktów[13] wpadł do pokoju i ogłosił, że jego kolega, Michel Kress zidentyfikował średni antygen T wirusa SV40 – było to białko o masie cząsteczkowej 53 kDa" – pisał Soussi w krótkim tekście poświęconym historii p53, opublikowanym w magazynie naukowym w 2010 roku. Kiedy jednak dalsze eksperymenty pokazały, że nowe białko odkryte przez Kressa w zakażonych SV40 komórkach nie pochodzi z wirusa, lecz od gospodarza, nikt tak naprawdę nie wiedział, co z tym dalej zrobić. Kress i państwo May opublikowali wyniki swoich badań bez upiększeń w niszowym „Journal of Virology", czytanym prawie wyłącznie przez specjalistów [wirusologii].

Pierre May zmarł w 2009 roku, zaś Evelyne May i Michel Kress są już na emeryturze, dlatego o odkryciu p53 w Paryżu rozmawiam z Thierrym Soussim w Instytucie Karolinska

w Sztokholmie, w którym teraz pracuje. Po wprowadzeniu mnie do jasnego, nowoczesnego gabinetu naprzeciwko laboratorium, Soussi włącza ulubioną operę, zdejmuje z półki stary segregator i otwiera go, zdmuchując kurz z pachnących stęchlizną, pożółkłych, zapisanych na maszynie kartek. To oryginalny egzemplarz pracy doktorskiej Kressa i jego artykuł na temat p53. Soussi przekartkowuje je, mówiąc z żalem w głosie: „Michel Kress został zapomniany i uważam, że to wielka szkoda. Zapomniano o nim z dwóch powodów. Po pierwsze, on w ogóle nie był ambitny. Po drugie, w rok po odkryciu p53 napisał doktorat i postanowił kontynuować studia. Trafił do bardzo dobrego laboratorium. Chciał tam dalej badać p53, ale przełożeni powiedzieli mu, że p53 nie ma żadnej przyszłości i będzie się zajmował czymś innym. Dlatego musiał zrezygnować z p53 już na samym początku – co zresztą przyszło mu z łatwością, ponieważ wtedy nikt do końca nie wierzył, że to naprawdę ważne odkrycie. Trudno się czymś ekscytować, jeśli nie wiemy, co to jest".

Wyjątkiem był, jak się wydaje, Pierre May, który, jak twierdzi w rozmowie telefonicznej jego żona, od samego początku miał przeczucie, że to odkrycie okaże się ważne. W ciągu kolejnych dziesięcioleci May zdobył liczne prestiżowe nagrody za swoje prace nad tym genem, choć w chwili odkrycia go w 1979 roku miał poważne problemy z zebraniem funduszy niezbędnych, by kontynuować badania.

Jak na ironię, w przypadku Soussiego właśnie ta pełna rezerwy reakcja na odkrycie p53 była powodem, dla którego zdecydował się on kontynuować badanie genu, kiedy w 1983 roku dołączył do zespołu Maya. Uznał, że będzie to spokojna praca na uboczu, z dala od presji i rywalizacji, z którą będzie mógł sobie spokojnie

poradzić i z łatwością połączy ją z zajęciami dydaktycznymi, które miał prowadzić jako wykładowca uniwersytecki. Dziś uśmiecha się na myśl o tym, jak bardzo się mylił – zresztą nie tylko on. „Byłem wtedy promotorem pewnej studentki, która pisała pracę na temat p53, a po obronie chciała się ubiegać o posadę w INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), który jest francuskim odpowiednikiem [amerykańskich] Narodowych Instytutów Zdrowia. Poprosiliśmy dyrektora INSERM, by dołączył do komisji egzaminacyjnej podczas obrony pracy magisterskiej. Na zakończenie dyrektor zwrócił się do mojej podopiecznej, mówiąc: «W porządku, rozumiem, że chce pani u nas pracować. Nie powinno być żadnego problemu, ma pani świetne kwalifikacje. Tylko niech pani już nie zajmuje się tym bzdurnym białkiem; będzie pani musiała zmienić temat». Dokładnie tak jej powiedział! Na początku lat 80. nikt nie mógł uczciwie przewidzieć, jakie będzie znaczenie p53 – było to niemożliwe".

Również David Lane napotykał początkowo podobne trudności, pomimo jego własnego głębokiego przekonania, że p53 pełni bardzo ważną rolę – może nawet kluczową – w rozwoju nowotworów. Niedługo po swoim odkryciu spędził kilka miesięcy w mieszczącym się w stanie Nowy Jork centrum badawczym Cold Spring Harbor na Long Island, kierowanym przez Johna Watsona, jednego z wielu pracujących tam laureatów Nagrody Nobla. Jeden z nowych kolegów Lane'a, nieprzekonany do jego najnowszego osiągnięcia, przewidywał, że pewnego dnia Lane będzie się wstydził swoich twierdzeń o ogromnym znaczeniu p53.

INNA DROGA DO TEGO SAMEGO ODKRYCIA

Czwartym odkrywcą p53 w 1979 roku był Lloyd Old, który zmarł na raka prostaty w 2011 roku. Old, urodzony w San Francisco w 1933 roku, po ukończeniu studiów w Paryżu oraz na Uniwersytecie Kalifornijskim w Berkeley, rozpoczął karierę zawodowego skrzypka. Dopiero po kilku latach fascynacja nauką pokonała ambicje muzyczne i Old poświęcił się medycynie. Był pionierem w dziedzinie immunologii nowotworów, która bada interakcje między systemem odpornościowym człowieka a komórkami rakowymi. Kiedy właśnie próbował rozwiązać jedną z najważniejszych i najtrudniejszych zagadek immunologii nowotworów – czyli dowiedzieć się, jaki czynnik występujący w niektórych komórkach nowotworowych, a nieobecny w innych, alarmuje system odpornościowy i uruchamia produkcję przeciwciał rozpoznających właśnie te komórki – zupełnie przypadkowo odkrył p53.

Podobnie jak w przypadku badań nad wirusami, także i tutaj nieznane białko było połączone z innym, które Old i jego zespół próbowali wyizolować w swoich laboratoriach w Memorial Sloan Kettering w Nowym Jorku. Posługiwali się w tym celu specjalnie opracowanymi przeciwciałami o właściwościach podobnych do magnesu umożliwiającego wydobycie kawałków metalu ze sterty innych materiałów. Zaintrygowani swoim odkryciem, naukowcy próbowali zidentyfikować to nowe białko we wszystkich rodzajach komórek badanych myszy, zarówno tych zdrowych, jak i zrakowaciałych. Nie wykryli p53 w żadnej zdrowej komórce, ale za to znaleźli je we wszystkich komórkach nowotworowych, co podsunęło im wniosek, że musi ono odgrywać istotną rolę w procesie powstawania raka.

Old i jego koledzy opublikowali wyniki swoich badań w magazynie „Proceedings of the National Academy of Sciences”

(„PNAS”). Ze względu na – istniejące niestety do dziś – problemy w komunikacji pomiędzy rozmaitymi dziedzinami badań nad nowotworami, musiał minąć rok, zanim immunolodzy i wirusolodzy zorientowali się, że mówią o tym samym. Tylko czym dokładnie było to, co zwróciło uwagę pracujących niezależnie grup naukowców, przyglądających się wnikliwie różnym tropom w laboratoriach badawczych rozsianych po całym świecie? To pytanie zaczęło rozgrzewać umysły całej społeczności badaczy raka. Coraz więcej uczonych uświadamiało sobie, że p53 to coś więcej niż nieistotna substancja zanieczyszczająca, którą można zignorować. Że jest to raczej czynnik, który może być kluczowy dla transformacji komórek. Żeby się dowiedzieć, czy rzeczywiście tak jest, musieli sklonować gen.

ROZDZIAŁ 4

Ukryte życie

...w którym przyglądamy się maszynerii komórki, by dowiedzieć się, w jaki sposób geny produkują białka, które wykonują w zasadzie całą pracę w naszym organizmie.

* * *

Każda żywa komórka to cud natury. [Konstrukcja] nawet najprostszych z nich przekracza możliwości ludzkiej pomysłowości. Aby zbudować podstawową komórkę drożdży, musielibyście zminiaturyzować mniej więcej tyle elementów, z ilu złożony jest Boeing 777, tak, by zmieściły się w kuli o średnicy zaledwie pięciu mikrometrów. Następnie musielibyście w jakiś sposób przekonać tę kulę, by zaczęła się replikować.

Bill Bryson[14]

Wczesne lata 80. ubiegłego wieku były niezwykle ekscytującym okresem w dziedzinie badań biologicznych dzięki nowym dostępnym narzędziom – możliwości klonowania i sekwencjonowania genów. By ułatwić lepsze zrozumienie dalszej części opowieści o p53, przypomnę kilka podstawowych informacji z biologii. Za niemal wszystko, co dzieje się w naszych organizmach, odpowiadają białka. Są one produkowane, lub też

„kodowane” przez geny, zawierające informacje o strukturze poszczególnych rodzajów białek. Białka produkowane są tylko wtedy i tylko tam, gdzie są potrzebne, po uruchomieniu odpowiedniego genu. Istnieją również mechanizmy umożliwiające usuwanie białek, które spełniły swoje zadanie. Jeśli dane białko nie jest potrzebne, gen siedzi sobie cichutko w komórce i nic nie robi.

W procesie sekwencjonowania DNA można, że się tak wyrażę, uzyskać dokładny przepis na kodowane przez gen białko, a także zidentyfikować cel jego powstania i funkcję w komórce. Posiadanie natomiast sklonowanego genu – czyli niezliczonej liczby jego identycznych kopii – otwiera możliwości wykonywania wszelkiego rodzaju doświadczeń na kulturach komórek wyhodowanych w laboratorium. To pozwala odpowiedzieć na rozmaite pytania dotyczące działania genu. Dziś klonowanie jest stosunkowo prostym procesem, zajmującym dzień lub dwa, ale na początku lat 80. było to wielkie wyzwanie i cały proces mógł trwać wiele miesięcy, a nawet lata. Dodatkowym utrudnieniem był fakt, że do klonowania wykorzystywano rekombinowane DNA. Technologia ta była ciągle nieco kontrowersyjna po pamiętnej konferencji w Asilomar[15], podczas której, jak zapewne pamiętacie, zaniepokojeni naukowcy zgromadzili się na kalifornijskim odludziu, by debatować o przyszłości zmutowanych gatunków.

Warto przez chwilę zastanowić się nad tym, jak w rzeczywistości wygląda praca biologów molekularnych – otoczonych probówkami, pipetami, szalkami, żelami i inkubatorami. Czemu się tak naprawdę przyglądają? Jakie zapachy czują? I co, oprócz podstawowych zmysłów, muszą wykorzystywać, by zrozumieć, co widzą? „Najwspanialszą rzeczą

w biologii molekularnej jest fakt, że tak naprawdę wymaga ona wiary" – mówi Peter Hall. „Wszystkie dane pasują do modelu; tworzycie go i testujecie, ale nie możecie go zobaczyć. O, nie. Wcale. Tak naprawdę musicie wydedukować go na podstawie wyników przeprowadzonych doświadczeń, które można przecież różnie interpretować".

Na tym polega „niewidzialna" natura biologii molekularnej – wynikająca z faktu, że większość cząsteczek jest mniejsza niż długość fali światła – która może utrudniać jej zrozumienie i zniechęcać laików. Jednak kogoś, kto jest odpowiednio przygotowany i potrafi jak nurek głębinowy operować w obcym środowisku, czeka fascynujący, pełen wspaniałych odkryć świat. Dlatego w duchu najlepszych tradycji naukowych spróbujmy przełożyć to, co uczeni wydedukowali z doświadczeń nad podstawami funkcjonowania komórek, w obrazy i pojęcia, które ułatwią nam zrozumienie tych mechanizmów.

Przede wszystkim nie jest do końca prawdą, że w biologii molekularnej wszystko jest niewidoczne. W określonych warunkach, spoglądając przez mikroskop elektronowy, można tak naprawdę zobaczyć DNA, które jest „megacząsteczką". Czasem pojawia się w postaci cienkiej nici w komórce, podobnej do włókna bawełny. Ale najłatwiej je zobaczyć, kiedy jest upakowane za pomocą struktur zwanych histonami i ułożone w pary chromosomów, tuż przed podziałem komórki, zwłaszcza jeśli użyjemy specjalnego znacznika, który uczyni je dostrzegalnym. Jednak żaden z mikroskopów dostępnych większości laboratoriów nie pokaże DNA wystarczająco szczegółowo, by naukowcy mogli określić sekwencję „zasad" składających się na cząsteczkę. Dlatego geny przenoszone przez chromosomy – nie jako oddzielne fragmenty DNA, ale jako

segmenty nieprzerwanego łańcucha materiału genetycznego – pozostają niewidzialne, a to właśnie tych skrawków informacji zawierających struktury białek poszukują badacze.

Słynna, przypominająca korkociąg struktura DNA – podwójna helisa odkryta przez Jamesa Watsona i Francisa Cricka w 1953 roku – zbudowana jest z połączonych w łańcuch elementów zwanych nukleotydami, ustawionych jeden na drugim, jak miniaturowe klocki Lego. Każdy nukleotyd lub klocek, ma trzy składniki: deoksyrybozę (D w DNA), resztę kwasu fosforowego i jedną z czterech zasad azotowych – adeninę (oznaczaną literą A), tyminę (T), guaninę (G) lub cytozynę (C). Długie spiralne wstęgi DNA składają się z dwóch nici, a zasady na jednej z nich połączone są z zasadami na drugiej, przez co cała wstęga przypomina wyglądem spiralną drabinę. Bez względu na rodzaj organizmu, zasady łączą się zawsze jednakowe pary – A z T, a G z C.

Długość DNA mierzymy liczbą par zasad. Ludzkie DNA ma długość 3 mld par zasad, zatem w każdej z bilionów komórek w naszym ciele, z wyjątkiem dojrzałych czerwonych krwinek, mamy około 1,8 metra tego kwasu. Być może łatwiej wam będzie zrozumieć rozmiary świata, w którym pracują mikrobiolodzy, wiedząc, że gdybyśmy rozwinęli i rozciągnęli całe DNA, które znajduje się w naszych ciałach, miałoby ono długość 6 tys. razy większą, niż odległość między Ziemią a Księżycem. Ta niewyobrażalnie długa cieniutka nić zawiera instrukcję budowy i obsługi skomplikowanego mechanizmu, jakim jest każdy z nas. Nic dziwnego zatem, że naukowcy, którzy próbowali rozszyfrować tę instrukcję w ramach Human Genome Project, byli nie tylko zaskoczeni, ale wręcz zszokowani odkryciem, iż geny [kodujące], czyli te elementy DNA, które wykonują najważniejszą pracę,

stanowią zaledwie 2–3 proc. całości – złożonej z 20,5 tys. genów, każdy o długości od 10 tys. do 15 tys. par zasad. Ponieważ naukowcy nie mieli pojęcia, jaka jest rola pozostałych genów, nazwali je roboczo „śmieciowym DNA".

Było to w 2000 roku. Od tego czasu badaczom udało się już ustalić funkcję ok. 80 proc. materiału zwanego dziś, nieco poważniej, „niekodującym DNA". Jego funkcją jest regulowanie ekspresji genów – określanie, kiedy, gdzie i w jakiej ilości, powinny zostać włączone. Ponieważ w każdej komórce znajduje się DNA o identycznym składzie i kompletny zestaw genów, regulacja jest niezbędna, by różnicować zachowanie komórek w różnych narządach – na przykład zachowanie komórek wątroby od zachowania komórek mózgu czy zachowanie komórek mózgu od zachowania komórek kości lub skóry. Dzięki „przełącznikom" w niekodującym DNA, w komórkach inicjowane są tylko geny właściwe dla danego narządu, zaś wszystkie inne geny pozostają nieaktywne.

Kiedy gen zostaje uruchomiony, organizm odczytuje zawarty w nim przepis i na tej podstawie tworzy odpowiednie białko. By mogło do tego dojść, trzeba rozdzielić dwie nici DNA i wydobyć zawartą wewnątrz informację genetyczną. Łatwiej będzie wyjaśnić ten proces, jeśli odejdziemy na chwilę od analogii spiralnej drabiny i porównamy DNA do zamka błyskawicznego. Niewielki enzym o nazwie helikaza rozplątuje DNA na chromosomie przenoszącym odpowiedni gen, a następnie rozpina je tak, by umożliwić odczytanie przepisu. DNA przechowywane jest w jądrze komórkowym, ale białka tworzone są w ciele komórki, w cytoplazmie, poza jądrem. Ponieważ cząsteczka DNA jest zbyt duża, by przedostać się przez pory jądrowe, inny enzym, o nazwie polimeraza, kopiuje

informację genetyczną na mniejszą cząsteczkę, tzw. matrycowy RNA (mRNA). Tworzy to pojedynczą uzupełniającą nić DNA. mRNA opuszcza jądro i kieruje się do rybosomu, czyli fabryki białek znajdującej się w ciele komórki.

Białka powstają z aminokwasów, których znamy 20 rodzajów. Instrukcje pochodzące z genu określają, które aminokwasy, w jakiej kolejności i w jakiej liczbie powinny zostać wykorzystane do stworzenia białka. W tym procesie ciąg pojedynczych liter, odpowiadających kolejnym parom zasad w genie, A – T, G – C, musi zostać przełożony na bardziej złożone „słowa", tak aby fabryka białek w rybosomie mogła odczytać liniową informację zawartą w nici mRNA w trzyliterowych jednostkach. Jednostki te, lub „słowa", nazywane są kodonami. Decydują one o tym, które aminokwasy powinny zostać wykorzystane do syntezy określonego białka. Aminokwasy przenoszone są do rybosomu z innych części komórki przez transportujący RNA (tRNA), który przyłącza się do odpowiednich kodonów i pozostawia swój ładunek aminokwasów. Kiedy wszystkie aminokwasy są na miejscu, zostają powiązane w łańcuch, który odłącza się od nici mRNA i przechodzi do innej części komórki, gdzie zostaje upakowany. Proces ten jest niezwykle istotny, ponieważ o funkcji białka decyduje nie tylko zestaw aminokwasów, z których jest zbudowane, ale również sposób upakowania.

Innym procesem biologicznym, niezwykle istotnym z perspektywy p53, jest replikacja DNA, która odbywa się w każdej komórce przygotowującej się do podziału. W tym procesie również aktywny jest enzym helikaza, który rozplątuje DNA i rozpina je – ale nie na całej długości, tylko kawałek po kawałku. Drobne cząsteczki, nazywane białkami wiążącymi

jednoniciowe DNA, przyłączają się do każdej nici, stabilizując ją w czasie kopiowania i zapobiegając ponownemu połączeniu nici. Następnie polimeraza DNA przesuwa się wzdłuż każdej nici, dodając nowe nukleotydy – opisywane wcześniej miniaturowe klocki Lego – do istniejących i łącząc zasady w stałe pary, A z T i G z C. W ten sposób, klocek po klocku, powstaje nowa równoległa nić DNA. Specjalna podjednostka polimerazy „weryfikuje" nowe DNA, sprawdzając, czy zostało wiernie skopiowane. Na koniec enzymatyczny klej o nazwie ligaza DNA scala fragmenty skopiowanego DNA w dwuniciową wstęgę, która automatycznie się zaplątuje.

W replikowanym DNA jedna z nici podwójnej helisy będzie pochodzić z oryginału (nić macierzysta), a druga będzie nową kopią (nić pochodna). Po replikacji komórka jest gotowa do podziału na dwie komórki o jednakowej liczbie identycznych informacji genetycznych. Proces ten, przebiegający nieprzerwanie w miliardach komórek w naszych ciałach, kiedy goją się rany, odnawiają się tkanki lub rosną włosy i paznokcie, jest tak skuteczny, że mutacje – błędy, które umykają korekcie – zdarzają się raz na 10^9 replikowanych nukleotydów.

Warto przypomnieć, że fundamentem całej wiedzy na temat działania mechanizmów życia było odkrycie struktury DNA przez Watsona i Cricka. Podwójna helisa – spiralna klatka schodowa narysowana po raz pierwszy przez żonę Cricka, Odile, jako ilustracja artykułu dla „Nature" – pozostaje do dziś jednym z najbardziej znanych symboli dwudziestowiecznej nauki. A jednak kiedy artykuł ukazał się w 1953 roku, przyciągnął uwagę zaledwie wąskiej grupy wybitnie uzdolnionych i ambitnych naukowców pracujących w tej samej dziedzinie. Niektórzy z nich

zresztą rywalizowali z Watsonem i Crickiem w wyścigu do tego odkrycia.

Jeśli chodzi o media, jedynie brytyjska gazeta „News Chronicle" opublikowała tekst o „niezwykłym odkryciu pokazującym co sprawia, że jesteśmy tym, kim jesteśmy...". Przez kolejną dekadę tylko niewielka grupa spośród naukowców piszących o DNA wspominała o podwójnej helisie. Był to piękny i elegancki model, lecz wielu biochemików skoncentrowanych na badaniu procesu syntetyzowania białek w naszych komórkach bardzo sceptycznie podchodziło do koncepcji, że geny – pojęcie dosyć abstrakcyjne na początku lat 50. ubiegłego wieku – mają cokolwiek wspólnego z tym procesem.

ROZDZIAŁ 5

Klonowanie genu

...w którym czytamy o wyzwaniach technologicznych, a także o gorącej rywalizacji w dążeniu do sklonowania p53, będącego pierwszym krokiem w procesie odkrywania mechanizmu funkcjonowania genu i jego białka.

* * *

Stoimy po złej stronie tkaniny – widać tylko pomieszane kolory, węzły i luźne końcówki nici. Ale możecie być pewni, po drugiej stronie widnieje jakiś wzór.

Anonim

Zarówno chłodne przyjęcie, jak i powolny proces zyskiwania uznania dla odkrycia podwójnej helisy – zakończony przyznaniem w 1962 roku nagrody Nobla Jamesowi Watsonowi, Francisowi Crickowi oraz biofizykowi Maurice'owi Wilkinsowi – okazały się bardzo pouczające. Peter Hall mówi, że tak właśnie wygląda nauka. „Przypomina to nieco sytuację zamkniętego w ciemnym magazynie człowieka, który ma przy sobie tylko kieszonkową latarkę. Może dostrzec jedynie drobną część wszystkich znajdujących się tam zapasów. Całość staje się widoczna dopiero, kiedy zyska więcej światła".

Zanim udało się sklonować p53 naukowcy błąkali się w ciemności bez choćby najmniejszej latarki. W latach 80. XX wieku garstka badaczy pracujących w laboratoriach na całym świecie – od Wielkiej Brytanii, przez Stany Zjednoczone i Rosję, po Izrael – ścigała się, próbując sklonować gen, czy też uzyskać identyczne jego kopie. Wszyscy zdawali sobie sprawę, że będzie to pierwszy krok na drodze do odkrycia, czym tak naprawdę jest i w jaki sposób funkcjonuje [p53]. Udało się to Moshe Orenowi, który rozpoczął swoje badania jako adiunkt naukowy w laboratorium Arniego Levine'a w Princeton, a dokończył je w Instytucie Naukowym Weizmanna w Izraelu. Tam właśnie, jakieś trzydzieści lat później, spotykam się z nim w pewne gorące październikowe popołudnie. Kiedy wchodzę do jego niewielkiego gabinetu na najwyższym piętrze instytutu, z widokiem błękitnego nieba za oknem, wita mnie zapach cytrusów. Oren siedzi za biurkiem, a przed nim leży kupka pomarańczowych skórek i pestek. Mówi, że to mandarynki z jego ogrodu, zerwane tego ranka i częstuje mnie nimi. Rozmawiamy, jedząc słodkie owoce.

„Szukałem nowego projektu, bo potrzebowałem zmian. Usłyszałem o tym ciekawym białku, które wzbudzało coraz większe zainteresowanie i pomyślałem, że to moja szansa, aby coś sklonować" – wspomina. „W tamtym czasie klonowanie było naprawdę poważnym wyzwaniem. Cały proces, od momentu podjęcia decyzji do faktycznego sklonowania genu, trwał ponad dwa i pół roku. Wymagało to przygotowania licznych procedur i przetestowania rozmaitych metod, z których część była całkowicie nieskuteczna. Postęp, jaki się dokonał od tamtej pory jest naprawdę zadziwiający. Dziś klonowanie genów jest banalnie proste, prawie jak szkolne doświadczenie! Ale kiedy zaczynaliśmy,

mieliśmy do dyspozycji bardzo ograniczone narzędzia, wcześniej sklonowano bardzo niewiele genów, zazwyczaj przy pomocy różnych improwizowanych sztuczek... Nie, wtedy wcale nie było łatwo".

Jednym z najtrudniejszych zadań klonującego jest, również dziś, wyodrębnienie pojedynczych genów z całej nici DNA – ustalenie, w którym miejscu kończy się jeden gen a zaczyna kolejny. Strategią przyjętą przez Orena było wyszukiwanie genu tuż po jego uruchomieniu, kiedy to odpowiedni fragment DNA zostaje skopiowany lub „przeniesiony" na matrycowe RNA (mRNA), opuszcza jądro komórki i udaje się w kierunku rybosomu – fabryki białek – w ciele komórki. Przy pomocy przeciwciał przystosowanych specjalnie do rozpoznawania białka p53 pośród masy innych białek wytwarzanych w tym samym czasie, Oren wyizolował odpowiedni rybosom oraz skrawki mRNA. Następnie, wykorzystując mRNA jako wzór, zsyntetyzował „komplementarny" DNA (cDNA), dołączając kolejne nukleotydy jeden po drugim, na całej długości, i tworząc odpowiednie pary zasad. Miał nadzieję, że to cDNA da mu wierną kopię genu p53 albo przynajmniej tej jego części, która odpowiada za produkcję białka.

Chcąc pomnożyć skrawki DNA, Oren wszczepił je bakterii E. coli, która – jak być może pamiętacie z opowieści o konferencji w Asilomar – jest jedną z najczęściej wykorzystywanych w biotechnologii, ponieważ łatwo nią manipulować, skutecznie pobiera nowy materiał genetyczny i, odpowiednio karmiona, wypompowuje klony w błyskawicznym tempie. By wszczepić bakterii cDNA, Oren musiał zastosować odpowiedni nośnik – coś, co przedostanie się do jej wnętrza i zamieszka tam, nie zabijając żywiciela. Wybrał do tego plazmid.

Plazmidy to malutkie pierścienie DNA o długości od 1 tys. do 10 tys. par zasad, które unoszą się wewnątrz komórek niektórych bakterii, niezależnie od ich własnego genomu. Kiedy bakteria umiera i jej ciało – pojedyncza komórka – rozkłada się, plazmidy zostają rozproszone w środowisku i często są absorbowane przez inne bakterie, które zaczynają przejawiać nowe cechy zakodowane w plazmidach. W taki sposób rekombinacja – zjawisko omawiane w Asilomar, które do dziś wywołuje kontrowersje w debacie publicznej i w świecie biotechnologii – przebiega w naturze, dostarczając wspaniałe narzędzie naukowcom zajmującym się klonowaniem. Umieszczają oni plazmidy w roztworze z fragmentami cDNA, które chcą skopiować, a następnie, wykorzystując specjalny enzym, przecinają pierścień plazmidu, tworząc szczelinę, w której ma się znaleźć nowy materiał. Przy drobnej zachęcie cDNA samodzielnie wsuwa się w szczelinę, a dodane do roztworu „enzymy naprawcze" wklejają je tam na stałe. Plazmid staje się cząsteczką rekombinowanego DNA – mieszanką materiałów genetycznych różnych organizmów. Osoba klonująca dodaje go później do innego roztworu zawierającego bakterie E. coli lub do jakiegokolwiek preparatu, który ma stać się „fabryką klonów" i czeka, aż stanie się on elementem nowego mechanizmu.

„Na papierze wydaje się to bardzo proste" – mówi Oren, kręcąc głową na wspomnienie miesięcy pracy pełnych prób, błędów i rozczarowań w królestwie biologii będącej poza zasięgiem wzroku. „Przez rok próbowaliśmy rozwiązań, które nie przynosiły efektu. Potem znaleźliśmy skuteczną metodę, ale natknęliśmy się na wiele fałszywie negatywnych klonów, zanim udało nam się uzyskać ten prawdziwy". Najtrudniejszą sprawą było nakłonienie plazmidowych nośników do przyjęcia nowego ładunku,

fragmentów cDNA genu p53. Oren i jego asystenci badali każde 10 plazmidów, by sprawdzić, czy się udało. Było to niezwykle pracochłonne zadanie, które zabrało im niemal 18 miesięcy życia.

„Na końcu procedura okazała się raczej nieskuteczna, a procent plazmidowych klonów zawierających cDNA genu p53 był rozczarowująco niski. Zbadaliśmy setki klonów – myślę, że w sumie około 1,8 tys. – zanim uzyskaliśmy pierwszy pozytywny wynik". Mówiąc to, Oren uśmiecha się i dodaje, że moment, w którym w końcu do tego doszło, był jednym z najbardziej ekscytujących w jego naukowej karierze. W 1983 roku wspólnie z kolegami opublikował wyniki swych badań w „PNAS".

Tymczasem w Princeton Arnie Levine postanowił, że po powrocie Orena do Izraela będzie kontynuował próby sklonowania p53 we współpracy z firmą farmaceutyczną Genentech i zatrudnioną w niej specjalistką w tej dziedzinie, Diane Pennicą. Wykorzystując inne niż Oren strategie i typy komórek, oni także odnieśli sukces i w następnym roku ogłosili swoje osiągnięcie w magazynie „Virology".

Również inni naukowcy podążali tym tropem i w 1984 roku w prasie naukowej oraz wśród zainteresowanych badaczy pojawiły się informacje o kolejnych klonach p53 uzyskiwanych z komórek o różnym pochodzeniu. Jednym z naukowców, którym udało się sklonować gen, był pracujący w londyńskim ICRF John Jenkins. Był on jednym z nielicznych specjalistów w dziedzinie klonowania w Wielkiej Brytanii, gdzie możliwości manipulowania materiałem genetycznym były poważnie ograniczone ze względu na kontrowersje wokół rekombinowanego DNA. Jenkins, który zajął się nauką stosunkowo późno – po tym, jak w wyniku poczucia

niedopasowania rzucił szkołę i, zanim do niej powrócił, przez pewien czas pracował jako robotnik i ogrodnik – dziś wspomina ostrą konkurencję wśród uczonych, pracujących nad sklonowaniem genu. „Oczywiście, zazwyczaj kieruje nami ambicja i dążenie do sukcesu, ale na pewnym etapie najważniejsza staje się czysta przyjemność z pokonania przeciwnika. W końcu to bardzo konkurencyjna branża! Zawsze taka była i zawsze będzie". Jenkins potwierdza, że sklonowanie p53 było bardzo trudne. To był najwyższy poziom nauki. „A na najwyższym poziomie wszystko jest wyzwaniem" – dodaje.

Kolejne pokolenia mikrobiologów nie zawsze zdawały sobie sprawę z tego, jak wielkim wyzwaniem było klonowanie na początku lat 80. ubiegłego wieku. „Miałem takie ciekawe zdarzenie wiele lat później" – opowiada Jenkins. „Jedna z moich współpracownic pomagała mi opróżnić gabinet. Natrafiliśmy wówczas na starą kopię mojej pracy doktorskiej. Widząc ją zapytała: «O, twoja praca. Mogę ją sobie przeczytać?». «Oczywiście, nie ma problemu. To stara historia» – odparłem. Kilka dni później oddała mi ją, mówiąc: «Nie wierzę, nic nie zrobiłeś i jeszcze dostałeś stopień doktora?». Odpowiedziałem: «Słuchaj, ciekawe, jak ty byś sobie z tym poradziła, gdybyś musiała sama przygotować wszystkie enzymy... Wtedy nie było żadnych gotowych zestawów... Większość z tego, co dla was jest dziś dostępne od ręki, wówczas było niedostępne. Na wszystko potrzeba było dużo więcej czasu – i wszystko było trudniejsze»".

Tak naprawdę Oren, Levine i Jenkins zostali pokonani. W fascynującej rywalizacji o to, kto pierwszy sklonuje p53, zwyciężył rosyjski uczony Peter Chumakow pracujący w moskiewskim Instytucie Biologii Molekularnej. Tyle że Chumakow – w grudniu 1982 – opublikował swoje wyniki

w czasopiśmie „Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR", rosyjskojęzycznym wydawnictwie właściwie nieznanym na Zachodzie. Poza Związkiem Radzieckim nie słyszano więc o jego osiągnięciach. Wcześniej, w 1979 roku, Chumakow obronił pracę doktorską na temat SV40. Poszukiwał projektu, który pozwoliłby mu odkryć, w jaki sposób duży antygen T wywołuje nowotwory i właśnie wtedy usłyszał o odkryciu genu p53. Zaintrygowany pomysłem, że to p53 może być kluczem do procesu [nowotworowej] transformacji komórek, postanowił sklonować gen, by uzyskać materiał do dalszych badań.

Jednak Chumakow napotkał na jeszcze większe trudności niż jego zachodni konkurenci. W jego laboratorium w Moskwie brakowało nawet podstawowego wyposażenia, takiego jak probówki czy pipety, które musiał co chwilę czyścić, by móc je ponownie wykorzystać. Musiał także zwrócić się do badaczki z Teksasu, Elizabeth Gurney, z prośbą o przesłanie próbki specjalnie opracowanych przez nią przeciwciał do p53, które, jak uznał Chumakow, były niezbędne dla realizacji jego przedsięwzięcia. Wysłał swoją prośbę bez wielkiej nadziei, że otrzyma to specjalistyczne narzędzie. „Pomyślałem, że nawet jeśli Elizabeth wyśle mi próbki, to na pewno paczka zawierająca podejrzany materiał zostanie zatrzymana albo na naszej granicy, albo podczas kontroli obejmującej w zasadzie wszystkie przesyłki z Zachodu" – powiedział. Miał jednak szczęście. Pewnego dnia, podczas odwiedzin u kolegi z sąsiedniego laboratorium, zauważył na biurku niewielką, wyglądającą na zagraniczną, paczkę i ze zwykłej ciekawości się jej przyjrzał. Ku swojemu zaskoczeniu i ogromnej radości odkrył, że była zaadresowana do niego i zawierała fiolkę z próbką przeciwciał oraz list z życzeniami sukcesu od Gurney.

To nieoczekiwane szczęście tak bardzo wzmocniło morale Chumakowa, że powrócił do badań, zdeterminowany, by wykonać swoje zadanie – zwłaszcza że wiedział teraz, iż nie jest jedynym uczonym na świecie, który próbuje sklonować ten ważny gen. Fakt, że był pierwszym, któremu się to udało, został ostatecznie uznany, kiedy jego artykuł ukazał się po angielsku. Wkrótce potem zaczęto go zapraszać na międzynarodowe spotkania i konferencje poświęcone p53. „Pamiętam, że w laboratorium panowała niezwykła atmosfera entuzjazmu i nadziei. Wszyscy czuliśmy się szczęśliwi, że mamy swój udział w tych niezwykłych odkryciach i jesteśmy częścią międzynarodowego świata nauki" – mówi Chumakow.

Dla wszystkich zespołów badawczych kolejnym krokiem po sklonowaniu genu p53 było określenie jego sekwencji – „słów" ułożonych przez pary zasad A i T oraz G i C, które dyktują aminokwasom strukturę wytwarzanych białek. „Sekwencjonowanie nie było specjalnie trudne, nawet w tamtych czasach" – wspomina Oren. „Było znacznie łatwiejsze od klonowania. Tyle że wszystko trzeba było robić ręcznie – przygotować DNA i wszystkie odczynniki, rozsmarować żel – wszystko po kolei. A potem trzeba było to samodzielnie odczytać i zinterpretować wyniki. Popełnialiśmy dużo błędów – ich przyczyną była jednak niewystarczająco precyzyjna metoda. Nie było to wyzwanie technologiczne. Zanim do tego doszedłem, mieliśmy już technika, który robił to rutynowo".

Mając informacje zdobyte podczas sekwencjonowania oraz potencjalnie nieograniczony dostęp do klonów – całych genów lub ich najważniejszych fragmentów – naukowcy mogli przystąpić do badań nad sposobem funkcjonowania p53 w komórce.

ROZDZIAŁ 6

Przypadek pomylonej tożsamości

...w którym dowiadujemy się, że:
a) my, ludzie, także nosimy w komórkach potencjalne onkogeny,
b) tym, co sprawia, że onkogeny stają się złośliwe, jest mutacja,
c) niemal wszyscy – błędnie – uznali [kiedyś], że p53 jest jednym z onkogenów.

* * *

Tak, jak każdy konfrontujący się z nowym problemem, naukowcy zaczynają od tego, co już wiedzą. Czy to w teoretycznych rozważaniach, czy przy stołach laboratoryjnych, rzadko opuszczają bezpieczne wody.

Horace Freeland Judson

W początkowym okresie badań nad funkcjonowaniem p53 przeważająca większość naukowców łączyła go z onkogenami, ponieważ pierwsze takie geny zostały odkryte w ludzkim DNA zaledwie kilka miesięcy wcześniej, w 1982 roku. Również tutaj decydującą rolę odegrał Bob Weinberg, jeden z pionierów badań nad onkogenami, więc zanim będziemy kontynuować nasze rozważania, zatrzymajmy się na chwilę, by przedstawić w skrócie historię Boba i jego pracy.

Weinberg urodził się w Pittsburghu w Pensylwanii i wychował w Stanach Zjednoczonych w rodzinie uchodźców z Europy, którzy przybyli do USA pod koniec lat 30. XX wieku. Jego ojciec, żyjący w Niemczech dentysta, obserwował rozwijający się w tym kraju faszyzm i wywoził pieniądze do Holandii, do swego brata. Kiedy w końcu zdecydował się na wyjazd do Stanów Zjednoczonych, miał wystarczająco duże oszczędności, by móc nostryfikować dyplom i rozpocząć praktykę dentystyczną w nowej ojczyźnie. Chociaż młody Weinberg nie doświadczył faszyzmu bezpośrednio, miał świadomość cierpienia swej rodziny w Europie i utraty licznych krewnych w Holokauście. Dorastał w silnym poczuciu niepewności. „Pamiętam, jak raz ojciec powiedział mi, że «dobrze jest odnosić w życiu sukcesy, ale nie należy się za bardzo rzucać w oczy, bo pewnej nocy przyjdą po ciebie faceci w brunatnych koszulach»".

Choć Weinberg, mężczyzna z sumiastym wąsem, dużą dozą autoironii i wyrazem twarzy Woody'ego Allena, twierdzi, że najlepiej czuje się w zabłoconym kombinezonie, sadząc kwiaty lub rąbiąc drewno w ogrodzie, jest bez wątpienia najbardziej znanym z całej grupy naukowców pracujących w trzech różnych laboratoriach, którzy w tym samym czasie dokonali doniosłego odkrycia pierwszego ludzkiego onkogenu[16]. Niezrażeni opisanym w Rozdziale 2 skandalem wywołanym przez nieuczciwego kanadyjskiego badacza, Weinberg i jego współpracownicy kontynuowali badania nad zjawiskiem, które zaobserwowali i opisali w 1979 roku. Było ono związane z występującymi w komórkach gryzoni onkogenami, które mogą być aktywowane zarówno w wyniku działania czynników chemicznych, jak i w efekcie infekcji wirusowej. W 1981 roku laboratorium Weinberga, a także ostro z nim rywalizujące

laboratorium Geoffreya Coopera z Harvard Medical School udowodniły, że onkogeny można znaleźć także w ludzkich komórkach nowotworowych.

W obu laboratoriach wykorzystano tę samą błyskotliwą i stosunkowo nową technikę nazywaną „transfekcją". Polega ona na tym, że pobiera się czyste DNA z komórek nowotworowych, tnie na kawałki, a następnie miesza w roztworze ze zdrowymi komórkami, które są przedmiotem badania. Badacz może manipulować roztworem w taki sposób, by skłonić komórki do pobrania unoszącego się wokół czystego DNA i dołączenia go do swojego własnego genomu. Następnie hoduje kulturę komórek na szalce Petriego i obserwuje je, szukając symptomów zrakowacenia. Komórki w naszych ciałach nieustannie się ze sobą komunikują. Zdrowe komórki słuchają instrukcji zapewniających uporządkowany wzrost i zazwyczaj przestają się dzielić po zbudowaniu jednowarstwowej kultury zajmującej całą powierzchnię szalki. Tymczasem komórki nowotworowe są nieposłuszne. Nie przestrzegają żadnych reguł, tłoczą się jedna na drugiej i tworzą na szalkach przypadkowe grudki, zwane ogniskami nowotworu. Tych właśnie ognisk szukali badacze z zespołów Weinberga i Coopera. I znaleźli je.

Zidentyfikowanie konkretnego, odpowiedzialnego za to genu (lub genów) przebiegało w ramach długotrwałego i żmudnego procesu eliminacji. Oznaczało konieczność powtarzania eksperymentu raz za razem, z różnymi kawałkami DNA pobranego z komórek nowotworowych. Jednak wszystkie trzy rywalizujące zespoły osiągnęły cel w ciągu 12 miesięcy i opublikowały swoje wyniki latem 1982 roku. Onkogen odkryty w DNA ludzkiego nowotworu został nazwany Ras. Podobnie jak w przypadku odkrytego przez Bishopa i Varmusa onkogenu Src,

także Ras okazał się homologiczny (tzn. bardzo podobny i prawdopodobnie wywodzący się od wspólnego przodka ewolucyjnego) z onkogenem wykrytym w wirusie – w tym przypadku w szczurzym wirusie mięsaka odkrytym w 1960 roku.

Rok później Mike Waterfield z ICRF w Londynie odkrył, że wirus powodujący w przeszłości mięsaka u małp przejął w czasie wspólnej historii ewolucyjnej jeden z naszych genów odpowiedzialnych za wzrost i regenerację, szczególnie istotny dla procesu gojenia ran. Był to kolejny dowód na to, że w ramach naszego normalnego pakietu DNA posiadamy geny – pełniące zazwyczaj pożyteczne funkcje w naszych komórkach – które w pewnych warunkach mogą nam szkodzić.

Tylko co to za warunki? Kiedy odkryto pierwszy onkogen, nikt jeszcze nie wiedział, że czynniki rakotwórcze – bez względu na to, czy są nimi związki chemiczne, infekcje czy radiacja – działają zazwyczaj przez zakłócanie naszego DNA. Co prawda Bob Weinberg miał przeczucie, że to właśnie mutacja jest zdarzeniem aktywującym potencjalne onkogeny, jednak znowu musiał stawić czoła grupie wątpiących kolegów, którzy zwracali uwagę, że niektóre chemiczne karcynogeny wcale nie wywołują mutacji. „Miałem z tym problem" – Weinberg wspominał w swoim eseju opisującym proces odkrywania onkogenów. „Wydawało mi się, że dobra prosta koncepcja nie powinna być podważana przez skomplikowane fakty".

Ostatecznie okazało się, że Weinberg miał rację i niedługo później zarówno on sam, jak i inni badacze odkryli, że gen Ras – który w normalnych warunkach odgrywa główną rolę w sterowaniu wzrostem, podziałem i zróżnicowaniem naszych komórek – może stać się złośliwy w wyniku zmiany pojedynczego nukleotydu, reprezentującego jedną literę

w składzie białka. Jeśli do takiej mutacji dojdzie we wrażliwym punkcie genu, Ras zostaje „włączony" na stałe, bez względu na otrzymywane sygnały, wywołując niekontrolowany podział i rozrost komórek. Było to prawdziwe objawienie, kolejna niezwykle istotna informacja na temat mechanizmów nowotworowych na najniższym, podstawowym poziomie. Magazyn „Nature" uczcił odkrycie ludzkiego genu Ras oraz jego mechanizmów aktywujących, ogłaszając rok 1982 „Rokiem Onkogenu".

Nikt jeszcze wówczas nie zdawał sobie sprawy z wagi tego odkrycia. Dziś wiemy, że do mutacji tego genu dochodzi w jednej czwartej przypadków raka u ludzi, w tym w niemal 50 proc. przypadków nowotworu jelita grubego i w 90 proc. przypadków nowotworu trzustki. W tamtym okresie, w miarę postępów badań nad onkogenami – zarówno pochodzenia komórkowego, jak i wirusowego – naukowcy coraz wyraźniej dostrzegali pewną niezwykle istotną prawidłowość. Działający w pojedynkę onkogen nie jest w stanie wywołać nowotworu. Żeby zaburzyć działanie mechanizmów komórkowych w stopniu wystarczającym do spowodowania raka, onkogeny muszą ze sobą współpracować. Początkowo badacze nie mieli żadnego pomysłu, dlaczego tak się dzieje, wiedzieli tylko, że tak jest. Na przykład, kiedy do komórek wszczepiano jednocześnie Ras i Myc – inny silny onkogen wykryty w DNA wirusów i zwierząt, w tym ludzi – efekty były jednoznaczne i spektakularne.

p53 WYGLĄDA JAK ONKOGEN

W 1984 roku, kiedy naukowcy rozpoczęli badania nowych klonów p53, dążąc do poznania sposobów funkcjonowania genu, bardzo

szybko doszli do wniosku, że p53 jest również onkogenem. Była to jedna z pierwszych koncepcji, które testowali, wykonując klasyczne doświadczenie – łącząc dwa silne onkogeny. Tyle że tym razem zastąpili Myc genem p53, by sprawdzić, czy efekt będzie podobny. „Połączyliśmy p53 z Ras, inni połączyli go z innymi onkogenami i wszyscy uzyskaliśmy wynik pozytywny" – wspomina Moshe Oren. „Od początku efekty były podobne jak w przypadku Myc, może trochę mniej oczywiste i widowiskowe. Dlatego wszyscy byliśmy przekonani, że p53 jest onkogenem. Może nie tak efektywnym jak Myc, ale przecież Myc to król onkogenów, a p53 to tylko jeden z rycerzy".

Warunkiem niezbędnym dla rozwoju nowotworu jest swego rodzaju „unieśmiertelnienie" komórek. Oznacza to, że zmutowane komórki mogą pokonać naturalne ograniczenia dotyczące liczby podziałów. Pojedynczy onkogen może uaktywnić tę cechę, sprawiając, że komórka znajduje się na granicy zrakowacenia, wystawiona na atak ze strony innego onkogenu, który sprawi, że granica ta zostanie przekroczona. Zespół Jenkinsa, pracujący w Instytucie Marii Curie zlokalizowanym na wsi w południowej Anglii, nieopodal miejscowości Oxted w hrabstwie Surrey, odkrył, że ich klon p53 posiada zdolność unieśmiertelniania komórek.

Inną wskazówką sugerującą, że to, czym się zajmują, jest onkogenem, był fakt, że p53 wytwarzał ogromne ilości białek – co naukowcy nazywają „nadekspresją" – w zmutowanych komórkach nowotworowych. „W tamtym okresie powszechnie uważaliśmy, że nadekspresja białek w komórkach rakowych musi być efektem działania onkogenu" – mówi Oren. „Tak przebiega transformacja wirusów, tak było napisane w książkach, tak wszyscy myśleli. Mniej więcej w tym czasie Varmus i Bishop

dostali Nagrodę Nobla za ich prace nad Src i pojawił się dogmat, iż onkogeny to geny, które są nadekspresywne w komórkach rakowych – czyniąc je komórkami nowotworowymi. Mieliśmy zatem idealnego kandydata – nadekspresywne białko w komórkach, prawda? P53 wygląda właśnie tak, jak zwykły onkogen".

Jednak podczas gdy wszyscy inni naukowcy uzyskiwali jasne i jednoznaczne wyniki badań nad klonami genów, doświadczenia Arniego Levine'a w Princeton kończyły się kolejnymi niepowodzeniami, co tylko zwiększało frustrację jego i całego zespołu. „Widzieliśmy publikację Weinberga oraz grupy Moshego, poświęconą badaniom, które wykazały, że p53 jest odpowiedzialny za [nowotworową] transformację komórek; widzieliśmy publikację Jenkinsa; Crawforda także. Tymczasem sami nie mogliśmy uzyskać takich wyników na naszym klonie. Byliśmy zdruzgotani!" – wspomina Levine. „Miałem wtedy dwóch ludzi w laboratorium, studenta Phila Hindsa i będącą adiunktem Cathy Finlay. Pracowali nad tym i widziałem, jak bardzo przeżywają to, że inni publikują swoje wyniki, a my nie możemy ich powtórzyć...".

Podobnie jak inni badacze, zespół Levine'a prowadził doświadczenia zaprojektowane w taki sposób, by potwierdzić przeczucie – oparte na dotychczas zgromadzonych dowodach – że p53 jest onkogenem. Ponieważ jako jedyni nie mogli potwierdzić uzyskiwanych przez innych wyników, uznali, że przyczyna ich niepowodzeń jest prosta: badany przez nich klon jest wadliwy. Coś jednak nie dawało im spokoju. W miarę jak kolejni naukowcy opisywali swoje sekwencje genów, członkowie zespołu Levine'a zauważyli, że ich klon różni się jednym kodonem – odpowiadającym jednemu elementowi białka –

jednak uznali tę różnicę za nieistotną. W tamtym okresie sekwencjonowanie było ciągle procesem wykonywanym manualnie i interpretowanym przez ludzi, a nie przez maszyny, dlatego trzeba było zawsze uwzględnić pewien margines błędu.

„Drobne błędy w sekwencjonowaniu były wówczas czymś na porządku dziennym, choć oczywiście należało się tego wstydzić" – przyznaje Oren. „Wiesz, niewielka różnica tu czy tam, zazwyczaj nie jest bardzo istotna – zwłaszcza jeśli białka wyglądają bardzo podobnie i widać, że biologicznie działają tak samo. Wtedy zazwyczaj to akceptujemy. Dlatego nie zastanawialiśmy się zbytnio nad znaczeniem różnicy w jednym aminokwasie. Uważałem, że to raczej ich [zespołu Levine'a] aminokwas jest zły, a mój dobry. Zasadniczo sądziłem jednak, że badamy to samo, więc nie przejmowałem się tym za bardzo".

Za to Levine i jego zespół przejęli się różnicą, ponieważ nie mogli pogodzić się z brakiem oczekiwanych wyników. Poprosili Orena, byłego pracownika ich laboratorium, o kopię badanego przez niego klonu, by spróbować szczęścia raz jeszcze. Oren chętnie się zgodził i naukowcy z Princeton wreszcie mogli uzyskać takie same wyniki, jak ich koledzy. Wszyscy jednak zdali sobie sprawę, że różnica jednego kodonu może mieć zasadnicze znaczenie. Nie dawało im to spokoju. Podczas jednego z okresowych spotkań, kiedy Oren odwiedzał Levine'a w Princeton, Phil Hinds sporządził listę opublikowanych przez różne laboratoria wszystkich dostępnych w literaturze opisów sekwencjonowania klonów. Jak wspomina Oren, jedynym klonem, który nie przyniósł żadnych efektów biologicznych, był klon wytworzony i wykorzystywany w pracowni Levine'a. „To było bardzo odkrywcze, ponieważ pod koniec spotkania stało się dla nas jasne, że wszyscy naukowcy, którzy uzyskali efekty

biologiczne, pracowali na zmutowanych klonach p53 – taki wniosek wyciągnęliśmy po analizie sekwencji. Klon Arnie'ego jako jedyny nie był zmutowany. Jego zespół wykorzystywał normalny («dziki») gen".

„Ale nie wyglądało to tak, że siedliśmy wspólnie i doznaliśmy nagłego olśnienia. Raczej dojrzewało to w nas od pewnego czasu, wszyscy bardzo intensywnie się nad tym zastanawialiśmy, aż w końcu udało nam się połączyć fakty podczas tamtego kilkugodzinnego spotkania. Kiedy porównujesz ze sobą dwa elementy, nie zawsze jesteś w stanie określić, który jest właściwy, a który błędny. Trzeba zdobyć znacznie więcej informacji, by móc dopasować wszystkie klocki i zrozumieć, co jest regułą, a co wyjątkiem".

To odkrycie było bardzo ważne, ale zanim jego znaczenie zostało w pełni docenione, musiało minąć trochę czasu. Poza wąskim gronem naukowców, którzy ciągle czerpali intelektualną przyjemność z klonowania i obserwacji rezultatów swoich eksperymentów, zainteresowanie genem p53 zmalało, kiedy pierwsze doświadczenia pokazały, że nie jest on aż tak istotny, jak się spodziewano, że jest raczej „tylko kolejnym onkogenem", w dodatku jednym ze słabszych. Było to okres, w którym młodych naukowców szukających pracy i obiecujących ścieżek rozwoju w konkurencyjnym świecie biologii molekularnej zniechęcano do badań nad p53, przekonując, że to temat bez przyszłości. Ci, spośród ich starszych kolegów, którzy pracowali już w tej dziedzinie, gdy odkryto nowy gen, podejmowali decyzję o porzuceniu problemu i poszukiwaniu nowych wyzwań.

Na niemal dekadę badania nad p53 utknęły w martwym punkcie. Kiedy jednak naukowcy przekonali się, że przez kilka lat byli wodzeni za nos przez zmutowane geny, zaczęli coraz częściej

zadawać sobie poważne pytanie: Jeśli p53 nie jest onkogenem, to czym w takim razie jest?

ROZDZIAŁ 7

Nowe spojrzenie na raka

...w którym dowiadujemy się o rewolucyjnym odkryciu supresorów nowotworowych – genów, których rolą jest chronić nas przed rakiem poprzez wykrywanie i eliminowanie komórek o zmutowanym DNA.

* * *

Nauka, mój chłopcze, składa się z błędów, które są użyteczne, ponieważ krok po kroku prowadzą do prawdy.

Juliusz Verne[17]

Z perspektywy czasu wiemy, że naukowcy wykonywali wiele doświadczeń z użyciem p53, które miały dać odpowiedź na pytanie o jego rzeczywistą funkcję. Jednym z takich naukowców była Varda Rotter, pracująca w laboratorium, dwa piętra niżej niż pracownia Moshego Orena, w Instytucie Naukowym Weizmanna. Dziś, w wieku ponad sześćdziesięciu lat, Rotter jest elegancką, zadbaną kobietą o mocnych rysach twarzy i krótkich, siwiejących włosach. Zajmowała się p53 od samego początku, często płynąc pod prąd, kiedy wyniki jej badań okazywały się sprzeczne z ogólnymi przekonaniami. Pasja i zaangażowanie Rotter są widoczne na pierwszy rzut oka,

a białko p53 stało się dla niej niemal żywą osobą, dobrym znajomym. Dla opisania go Rotter posługuje się określeniami „piękne", „potworne" oraz „osobowość schizofreniczna". Na ścianach jej gabinetu w Rehovot, obok oprawionych w ramy zdjęć mikroskopowych czy zdjęć jej samej w towarzystwie kolegów, wiszą narysowane przez jej wnuczkę obrazki przedstawiające p53 jako anioła i diabła. Rotter uśmiecha się szeroko, wspominając z sentymentem, jak rodzina traktowała jej obsesję na punkcie pracy. Jej córki były jeszcze dziećmi, kiedy, przygotowując habilitację, dołączyła do zespołu laureata Nagrody Nobla Davida Baltimore'a w laboratorium w MIT i wraz z nimi musiała się na pewien czas przeprowadzić do Stanów Zjednoczonych. „Pewnego razu, jedna z moich córek zapytana w szkole, co robią jej rodzice, odpowiedziała: «My mamy tatę i p53!»" – opowiada.

„Zawsze angażuję się w pracę całkowicie, po prostu taka jestem. Nawet dziś szefowa działu w moim laboratorium spytała: «Skąd u ciebie tyle entuzjazmu, przecież te dane nie mają większego znaczenia?». Odpowiedziałam jej: «No coś ty, nie widzisz, że to przełom?». A ona na to: «Tak, codziennie jest jakiś przełom...»" – śmieje się Rotter, naśladując zirytowaną koleżankę. „Sądzę, że jeśli ktoś ma inne nastawienie, to nie przetrwa" – dodaje nieco teatralnie.

W 1984 roku Rotter produkowała własne klony genu p53 i przeprowadzała eksperymenty na wirusach, które atakują komórki krwi, powodując białaczkę. Historia jest bezwzględna dla tych, którzy zajmują drugie miejsca. Gdyby było inaczej, to właśnie Vardę Rotter wymienialibyśmy dziś w gronie odkrywców p53. Natknęła się na jego gen w Baltimore już pod koniec lat 70., podczas badań nad wirusem myszy i jego

onkogenem nazwanym „Abelson” (w skrócie Abl). Podobnie jak inni, zauważyła, że podjęte przez nią próby wyizolowania białka Abl spośród pozostałych składników komórki rakowej, ujawniają również inne, połączone z nim białko o masie cząsteczkowej zbliżonej do 53 kDa. Jednak jej odkrycie zostało przyćmione publikacjami Lane’a, Levine’a i pozostałych, ogłoszonymi tuż przed jej artykułem [na ten temat]. Za to obserwacje Rotter w jej późniejszych doświadczeniach z komórkami białaczkowymi były całkowicie odmienne od spostrzeżeń jej kolegów badających funkcje p53. Nie tylko nie zauważyła ona nadmiaru białka. Przeciwnie – zdawało się, że gen gdzieś przepadł. Podobne obserwacje mieli kanadyjscy naukowcy, którzy także badali wirusy białaczki – u większości komórek rakowych krwi nie dało się dostrzec aktywności p53.

Obie grupy ogłosiły wyniki swoich badań w samym szczycie debaty na temat działania p53. Zastanawiałam się, jak to się stało, że cała reszta środowiska badawczego pogodziła te odkrycia z powszechnie panującym dogmatem, iż charakterystyczną cechą onkogenu jest nadekspresja białka. „Racjonalizacja” – podpowiada Moshe Oren. „Wiedzieliśmy, że biologia białaczek jest często inna niż guzów litych. Dało się więc powiedzieć: W porządku, może po prostu w białaczce wygląda to inaczej, może nie do końca rozumiemy zachowanie p53 w przypadku białaczki, ale wiemy, że przypadku typowych rodzajów nowotworu p53 zachowuje się dokładnie tak, jak powinien się zachowywać onkogen”.

Nie wszyscy dali się przekonać takiej argumentacji. W 1982 roku Lionel Crawford, u którego młody David Lane prowadził doświadczenia, gdy odkrył p53, opublikował artykuł poświęcony badaniu z udziałem pacjentek cierpiących na raka piersi. Poinformował w nim, że jedna na dziesięć badanych kobiet miała

w surowicy krwi przeciwciała przeciwko białku p53. Oznaczało to, że układy odpornościowe tych kobiet przygotowywały się do zaatakowania jednego z białek wytwarzanych przez ich własny organizm tak, jakby był to najeźdźca z zewnątrz. Spostrzeżenia Crawforda przeszły właściwe bez echa, ponieważ w tamtym okresie nikt nie rozumiał ich znaczenia. Zaintrygowały jednak Thierry'ego Soussiego, który nadal pracuje w paryskim laboratorium Pierre'a i Evelyne May'ów.

Soussi spojrzał na całą układankę z nieco szerszej perspektywy i zadał sobie pytanie: Czy fakt, że w przypadku większości litych guzów występuje nadmierne gromadzenie się białka p53 oraz fakt, że w niektórych przypadkach ta obfitość jest przyczyną wytwarzania przez układ odpornościowy przeciwciał anty p53, są ze sobą w jakiś sposób powiązane? Czy mogłaby to być wskazówka, że to białko – oraz kodujący je gen – uległy mutacji i przestały funkcjonować prawidłowo, w związku z czym układ immunologiczny traktuje je jako obce? Były to brzemienne w skutkach pytania. Jeśli odpowiedź na nie byłaby twierdząca, oznaczałoby to konieczność powrotu do punktu wyjścia i podjęcia na nowo prób określenia prawdziwej natury p53.

ALFRED KNUDSON I HIPOTEZA „DWÓCH UDERZEŃ"

Szukając wskazówek, które pomogłyby określić tę prawdziwą naturę, musimy cofnąć się do późnych lat 60. ubiegłego wieku, i przyjrzeć postaci Alfreda Knudsona – pediatry, człowieka wielu talentów, który pracował wówczas w MD Anderson Cancer Center w Houston w stanie Teksas. Tam właśnie Knudson opracował swoją teorię „dwóch uderzeń" opisującą proces

powstawania nowotworu, która miała stać się iskrą wzniecającą rewolucję w dziedzinie badań nad rakiem. Hipoteza mówiąca o dwóch uszkodzeniach DNA jest tak ważną koncepcją w historii p53, a informacje na temat Knudsona tak skąpe, że postanowiłam sama go odnaleźć, by opowiedział mi o tamtych wydarzeniach. Dlatego w pewne gorące lipcowe popołudnie w 2012 roku przyjeżdżam do Filadelfii, gdzie Knudson mieszka[18] ze swoją żoną Anną Meadows, specjalistką w dziedzinie onkologii dziecięcej.

Kiedy trafiam do ich apartamentu na poddaszu, gospodarze zapraszają mnie do dużego, eleganckiego salonu, przestronnego i pełnego światła, z widokiem na wąskie, zadrzewione uliczki Filadelfii z szeregową zabudową i niewielkimi ogródkami. Na podłodze leży gruby dywan w kolorze kremowym, a na ścianach wiszą rozmaite dzieła sztuki – obrazy i kolaże o tak żywej kolorystyce i oryginalnej kompozycji, że natychmiast przyciągają wzrok i prowokują do rozmowy. Jednak tym, co najbardziej zwraca moją uwagę, jest niezwykła, wykonana z metalowych odpadów rzeźba wielkości człowieka, przedstawiająca chudą postać z jednym wielkim okiem ozdobionym gęstymi rzęsami z gwoździ. Knudsonowie zauważyli ją na jednej z filadelfijskich wystaw, na otwartym powietrzu. Tak bardzo skojarzyła im się z najważniejszą pracą Alfreda dotyczącą siatkówczaka, dziecięcego nowotworu oka, która zainspirowała jego teorię „dwóch uderzeń", że postanowili ją kupić. „Jej autorką jest Zoila Perry, żona jednego z kolegów Ala" – wyjaśnia Anna, drobna ładna kobieta, zdecydowana i pełna energii. Rzeźba zainteresowała Knudsonów, ponieważ kiedy patrzy się na nią z jednej strony, oko jest niebieskie, a z drugiej zielone, co może symbolizować „dwa uderzenia". „Oboje badaliśmy siatkówczaka –

Al aspekty genetyczne, a ja kliniczne, w tym nowe terapie pozwalające uratować oczy".

Pierwszego wieczoru wyjmujemy z lodówki butelkę wina i idziemy na kolację do ulubionej włoskiej restauracji Knudsonów. Następnego dnia Alfred Knudson zabiera mnie do College of Physicians. Tam pokazuje mi bibliotekę ukrytą za ciężkimi drzwiami – wyciszoną salę pełną ciemnego drewna i zakurzonych ksiąg, w której możemy spokojnie usiąść i porozmawiać. Knudson ma już ponad dziewięćdziesiąt lat, jest szczupłym mężczyzną średniego wzrostu z bujną siwą czupryną, mówiącym głębokim, spokojnym głosem, ze wzrokiem niezmiennie skupionym na rozmówcy.

Urodzony w Los Angeles w 1922 roku Knudson był pierwszym członkiem swojej rodziny, który poszedł na studia. Już od najwcześniejszych lat szkolnych był przekonany, że jego przeznaczeniem jest kariera naukowa. Najczęściej wyobrażał sobie, że zostanie matematykiem lub fizykiem, jednak los pchnął go w stronę medycyny. Został przyjęty do California Institute of Technology (Caltech), gdzie w ramach studiów musiał odbyć kursy z chemii i biologii, a także z fizyki i matematyki. W trakcie naszej rozmowy wspomina te czasy z uśmiechem: „Wstyd się przyznać, jaki byłem naiwny i pewnie cię to rozśmieszy, ale doszedłem do wniosku, że w dziedzinie fizyki wszystko już wiadomo i raczej nic ciekawego nie zostało do odkrycia!". Z drugiej strony był przekonany, że biologia otwiera przed nim nieograniczone możliwości i ostatecznie zdecydował się studiować genetykę, która jego zdaniem łączyła biologię z jego ukochaną matematyką. „Oczywistym było, że w dziedzinie genetyki jest jeszcze bardzo wiele do odkrycia, bo przecież

w tamtym okresie nie wiedzieliśmy właściwe nic na temat dziedziczenia i chorób genetycznych".

Knudson był studentem Caltech, kiedy w grudniu 1941 roku Stany Zjednoczone przystąpiły do II wojny światowej. Wykładowcy poradzili mu, że jeśli chce kontynuować naukę, musi wstąpić do armii i złożyć wniosek o studia inżynierskie albo medyczne, ponieważ kierunki te uznano za strategiczne i studia były finansowane przez państwo. „Nie chciałem zostać inżynierem – miałem takie same wątpliwości, jak w przypadku fizyki, tylko jeszcze większe!". Knudson dostał się do Szkoły Medycznej Uniwersytetu Columbia w Nowym Jorku i po raz pierwszy w życiu opuścił południową Kalifornię. Postanowił specjalizować się w pediatrii. „U dzieci występuje wiele ciekawych chorób genetycznych, a ja miałem za sobą kursy z embriologii i pomyślałem sobie, że pediatria to wspaniała, ale mocno opóźniona dziedzina, w której drzemie potencjał nieodkrytych dotąd możliwości. Wierzyłem, że pediatria da mi szansę, by połączyć genetykę z biologią rozwoju i tak się stało".

Pierwsze poważne zetknięcie Knudsona z nowotworami u dzieci miało miejsce podczas jego stażu w New York Hospital, gdy musiał spędzić miesiąc w położonym po drugiej stronie ulicy Memorial Sloan Kettering Cancer Center[19]. „Był tam malutki oddział dziecięcy. Leżało na nim około 20 pacjentów. Widziałem wcześniej dziecko z guzem Wilmsa[20] i kogoś z białaczką, ale widok 20 dzieci chorych na raka po prostu zwalił mnie z nóg... Nigdy tego nie zapomniałem".

Knudson wstąpił do armii ponownie podczas wojny koreańskiej[21], ponieważ uznał, że i tak dostanie powołanie. Nigdy jednak nie znalazł się froncie, bo okazało się, że pediatrzy nie są tam potrzebni. Po dwóch bezczynnych latach spędzonych

w Fort Raleigh w stanie Kansas, Knudson uznał, że marnuje czas i postanowił powrócić do świata ideałów. Pojechał na Caltech, gdzie w 1953 roku zrobił doktorat z genetyki i biochemii, zaledwie kilka miesięcy po tym, jak Watson i Crick odkryli tajemnicę struktury DNA. Na fali przełomu w badaniach genetycznych uczelnia stała się miejscem gorącej debaty intelektualnej. Rewolucja w dziedzinie biologii molekularnej nabierała tempa.

Po uzyskaniu tytułu doktora Knudson przeniósł się do City of Hope Medical Center w Duarte, w Kalifornii, w którym został szefem nowego oddziału dziecięcego specjalizującego się w leczeniu nowotworów. Dziesięć lat później zaproponowano mu pracę w MD Anderson w Houston, gdzie miał kierować programem rozwoju badań genetycznych. Pracując tam, stworzył podstawy swojej „dwuuderzeniowej" teorii powstawania raka. Knudson doszedł do wniosku, że chcąc się dowiedzieć, jak przebiegają procesy nowotworowe na poziomie molekularnym, najlepiej będzie prowadzić badania na którymś z mniej skomplikowanych typów nowotworów. „Zaczynanie badań od czegoś takiego jak polipowatość raczej mija się z celem, prawda?" – mówi. (Knudson wyjaśnia mi, że polipy to mięsiste narośla na zdrowej tkance jelita, które mogą ostatecznie stać się złośliwe, jednak trwa to zwykle wiele lat i może przebiegać na różne sposoby). „Ale jeśli nowotwór jest u pacjenta od urodzenia, to musi być raczej prosty. Tak wtedy myślałem". Nowotworem, który spełniał to kryterium, okazał się siatkówczak. Dla Knudsona był idealnym przedmiotem badań.

Siatkówczak to rzadki nowotwór siatkówki, czyli części oka odpowiedzialnej za wykrywanie światła, który atakuje niemal wyłącznie dzieci poniżej piątego roku życia. Zaczyna się w komórkach macierzystych rozwijającej się siatkówki, które,

podobnie jak komórki macierzyste innych narządów, przeżywają okres gwałtownego podziału i wzrostu w czasie ciąży oraz w pierwszych latach życia człowieka. Wczesnym objawem choroby jest pojawienie się mlecznobiałego odblasku na źrenicy, który, jeśli pozostanie niezdiagnozowany i nieleczony, jak to często bywa w krajach rozwijających się, rozrasta się do ogromnych rozmiarów różowego, gąbkowatego guza, który zniekształca całą twarz dziecka i ostatecznie prowadzi do śmierci.

Knudson sam nigdy nie widział przypadków siatkówczaka. Tak naprawdę już kilka lat wcześniej zarzucił praktykę i leczenie pacjentów, by skupić się na badaniach genetycznych. Miał jednak szczęście. Dowiedział się, że dwaj lekarze – angielski pediatra oraz okulista z MD Anderson – przechowują szczegółowe opisy przypadków siatkówczaka, których byli świadkami. Poddając zgromadzone przez nich informacje wnikliwej analizie, Knudson zauważył, że nowotwór pojawiał się u dwóch grup pacjentów. Jedną byli ci, wywodzący się z rodzin, w których siatkówczak się powtarzał, a drugą przypadkowe osoby, u których guz pojawiał się sporadycznie. Dostrzegł również istotne różnice w przebiegu choroby u obu grup pacjentów. U dzieci z rodzin, w których rak się powtarzał, pojawiało się zazwyczaj kilka guzów w obu oczach, podczas gdy u pacjentów, u których nowotwór występował sporadycznie, miał postać pojedynczego guza w jednym oku.

Jakie wnioski wyciągnął Knudson ze swoich obserwacji? „Absolutnie genialne" w swojej prostocie i o ogromnym znaczeniu na przyszłość, jak stwierdził niemal 40 lat później Peter Hall, omawiając przełomy w dziejach badań nad nowotworami. Oto, w skrócie, historia, którą słyszę z ust samego Knudsona w tamten lipcowy dzień w cichej bibliotece w Filadelfii.

Każdy gen w ludzkim ciele z wyjątkiem komórek rozrodczych, czyli komórek jajowych i plemników, składa się z dwóch kopii (nazywanych „allelami"), z których jedną dziedziczymy po matce, a drugą po ojcu. Knudson zdał sobie sprawę, że w tych przypadkach siatkówczaka, które powtarzały się w wywiadzie rodzinnym, genem odpowiedzialnym za rozwój choroby był właśnie gen dziedziczony – chociaż pod koniec lat 60. XX wieku nikt jeszcze nie potrafił wyizolować ani zidentyfikować pojedynczych genów. Uważał też, że z ogromnym prawdopodobieństwem można przyjąć, iż tylko jedna kopia genu, jeden allel – odziedziczony po matce lub po ojcu – jest wadliwa w chwili urodzin, a zatem choroba może się rozwinąć dopiero w przypadku uszkodzenia także drugiego z alleli. Jego rozumowanie potwierdzał fakt, że nawet w obciążonych [występowaniem raka] rodzinach nowotwór nie pojawiał się u wszystkich dzieci, choć przecież wszystkie odziedziczyły po rodzicach te same geny i były jednakowo podatne na chorobę.

W sporadycznej postaci siatkówczaka uszkodzenia obu kopii genu pojawiały się przypadkowo i choroba rozwijała się dłużej – co wyjaśniałoby, dlaczego objawy występowały w późniejszym wieku, a choroba zazwyczaj miała postać pojedynczego guza.

Na podstawie tych wszystkich danych Knudson wyciągnął wniosek, że pojedyncza wadliwa kopia genu odpowiedzialnego za rozwój siatkówki oka nie wystarczy, by powstał nowotwór. Aby do tego doszło, również druga kopia musi ulec uszkodzeniu. Jednak – i to właśnie był rewolucyjny wniosek – dopóki zdrowa kopia nie ulegnie uszkodzeniu, wydaje się kontrolować wadliwą kopię i dlatego cała komórka funkcjonuje zupełnie prawidłowo. Dopiero kiedy obie kopie są wadliwe, komórka również zaczyna zachowywać się w sposób nieprawidłowy, co prowadzi

do rozwoju nowotworu. Innymi słowy, we wszystkich analizowanych przez Knudsona przypadkach choroba pojawiała się po tym, jak uszkodzeniu ulegał element komórki odpowiedzialny za jej normalne funkcjonowanie. Uczony zasugerował, że może chodzić o utratę jakiegoś czynnika hamującego niekontrolowany podział komórek. Była to prosta sugestia, tyle że sprzeczna z powszechną tendencją panującą wówczas w środowisku badaczy. W 1971 roku, kiedy Knudson ogłosił swoją hipotezę „dwóch uderzeń", przeważająca większość naukowców z jego branży koncentrowała się przede wszystkim na czynnikach wywołujących nowotwory, niedawno odkrytych onkogenach, dowodząc, że rak powstaje w wyniku zyskania przez gen nowej funkcji. Tymczasem Knudson sugerował istnienie równoważnej, ale przeciwnej siły, „antyonkogenów" (niedługo później nazwanych „supresorami nowotworowymi" lub „genami supresorowymi"), które muszą zostać wyeliminowane, by nowotwór się rozwinął. Tym samym twierdził, że choroba pojawia się na skutek utraty jakiejś funkcji genu.

Możemy posłużyć się porównaniem do samochodu, by lepiej zilustrować działanie przeciwstawnych sił w komórkach rakowych, o których mówi teoria Knudsona. Załóżmy, że onkogeny działają jak pedał gazu, zaś supresory jak hamulec. Uszkodzony pedał gazu może się zablokować, co powoduje, że samochód ciągle przyspiesza w niekontrolowany sposób (zyskanie funkcji). Z kolei, gdy dojdzie do awarii hamulca (utrata funkcji), nie będziemy mogli zatrzymać pojazdu. Efekt końcowy będzie zatem bardzo podobny. Idźmy jeszcze dalej. W większości samochodów mamy dwa układy hamulcowe. Jeśli jeden z nich zawiedzie, kierowca ma do dyspozycji zapasowy i w zasadzie oba muszą ulec awarii, by doszło do katastrofy. Podobnie jest

w przypadku nowotworów. Gen supresorowy przestaje blokować rozwój raka dopiero, kiedy obie jego kopie, oba allele, są uszkodzone. To właśnie jest najważniejszy wniosek wypływający z analizy przypadków siatkówczaka. Na nim Knudson oparł swoją „hipotezę dwóch uderzeń".

HENRY HARRIS UWAŻA TAK SAMO

Knudson opracował swoją teorię wykorzystując matematyczne modelowanie zgromadzonych danych. Istniały jednak również bezpośrednie dowody i doświadczenia, które potwierdzały jego wnioski. Pochodziły z laboratorium prowadzonego przez onkologa i genetyka Henry'ego Harrisa, upartego (według własnej oceny) i niezależnego Australijczyka, który w 1952 roku został zaproszony przez swojego rodaka Howarda Floreya – znanego ze współpracy z odkrywcą penicyliny, Aleksandrem Flemingiem – do prowadzenia wspólnych badań na Uniwersytecie Oksfordzkim.

Wiele lat później, opowiadając o swoich przenosinach z Sydney do Oksfordu, Harris powiedział swojemu rozmówcy: „Odebrałem telefon od Hugh Warda, profesora bakteriologii (w Sydney), który powiedział, że właśnie gości Florey'a w swoim biurze i zapytał, czy chciałbym z nim porozmawiać. Odpowiedziałem: «Chyba śnię, masz na myśli tego Floreya?». «Tak. Przyjeżdżaj zaraz» – powiedział. «Rzuciłem wszystko i natychmiast do niego pojechałem. I rzeczywiście, był tam Florey. Wyglądał jak drobny biznesmen, ale mówił krótko i bezpośrednio. Zagadnął mnie: «Ward mówi, że lubisz doświadczenia, czy to prawda Harris?». Odparłem: «Jasne, zawsze się nieźle bawię, można stłuc jakieś szklane naczynie albo trochę pohałasować». Zapytał: «Może

chciałbyś trochę popracować w Oksfordzie?». Odpowiedziałem: «To jakby zapytać człowieka na pustyni, czy chce się napić»".

Była to era wirusologów, których wiedza na temat wszelkich aspektów funkcjonowania komórek tak bardzo ekscytowała naukowców badających nowotwory, że głoszone przez nich teorie na temat powstawania raka – zazwyczaj w wyniku pojawienia się w komórce jakiejś agresywnej siły z zewnątrz – przesłaniały wszystko inne. „Moją reakcją na tę powszechną jednomyślność opinii było rosnące niedowierzanie" – napisał Harris w analizie przygotowanej dla Amerykańskiego Stowarzyszenia Biologii Eksperymentalnej (Federation of American Societies of Experimental Biology, FASEB). Stwierdził, że niezależnie od tego, czy mamy do czynienia z czynnikiem wirusowym, czy nie, liczba mutacji zachodzących naturalnie w ludzkich komórkach jest tak duża, że gdyby złośliwe mutacje zawsze były dominujące – czyli byłyby w stanie zmienić wszelkie inne instrukcje dotyczące funkcjonowania komórki – to niemal wszystkie dzieci rodziłyby się z rozwijającymi się nowotworami.

Podczas doświadczeń prowadzonych wspólnie z dwojgiem współpracowników, Georges'em Barskim i Francine Cornefert, które zdawały się potwierdzać teorie wirusologów na temat sił powodujących powstawanie nowotworów, Harris zwrócił uwagę na pewien aspekt całkowicie pomięty przez kolegów. Jedno z doświadczeń polegało na połączeniu uzłośliwionych mysich komórek z komórkami zdrowymi i obserwowaniu, który zestaw instrukcji okaże się silniejszy. Kiedy po pewnym czasie we wszystkich komórkach rozwinął się nowotwór, naukowcy wywnioskowali, że materiał genetyczny ze złośliwych komórek zdominował materiał znajdujący się w zdrowych komórkach. Fakt, że przy okazji zmian w komórkach nowotworowych

zmniejszyła się liczba chromosomów, uznali za nieistotny. Harris się z tym nie zgodził. Zastanawiał się, czy to możliwe, że w procesie uzłośliwienia komórki raczej utraciły część genów, które mogły hamować rozwój raka, niż zyskały nowe geny przyspieszające zmiany. Było to dokładnie to samo pytanie, które zadał sobie kilka lat później w Teksasie Alfred Knudson, analizując opisy przypadków siatkówczaka.

W ciągu następnych kilku lat Harris i jego koledzy z Oksfordu – przy współpracy laboratorium ze Sztokholmu, które dysponowało najlepszym materiałem do badań – próbowali znaleźć odpowiedź na to pytanie, łącząc uzłośliwione komórki różnego typu z komórkami zdrowymi. W swoich doświadczeniach dowiedli jednoznacznie, że aby w hybrydowej komórce powstał nowotwór, musi ona utracić część DNA – elementy, które prawdopodobnie hamują złośliwy rozrost, gdy działają prawidłowo. Opublikowali wyniki swoich doświadczeń w czasopiśmie „Nature" w 1969 roku, czyli dwa lata przed tym, jak Knudson opisał swoje badania nad siatkówczakiem – i na długo, zanim możliwe stało się zidentyfikowanie pojedynczych genów odpowiedzialnych za zmiany.

Harris i Knudson nie byli w stanie udowodnić swoich teorii, uniemożliwiały im to ograniczenia technologiczne. Obaj wyprzedzali swoją epokę, a ich koncepcje zostały ledwie zauważone przez środowisko.

ODKRYCIE PIERWSZEGO GENU SUPRESOROWEGO

Sytuacja zaczęła się zmieniać pod koniec lat 70., kiedy cytolodzy – naukowcy zajmujący się analizowaniem struktury i funkcji

komórki – zauważyli, że w komórkach nowotworowych dzieci cierpiących na siatkówczaka jeden z chromosomów na 13. parze jest skrócony. Wyglądał tak, jakby brakowało mu sporej części DNA. Co więcej, w przypadku dzieci z siatkówczakiem dziedzicznym chromosom 13 jest wybrakowany we wszystkich komórkach ciała[22]. Stanowiło to dla badaczy impuls do rozpoczęcia poszukiwań tego uszkodzonego genu. Od razu też rozpoczęła się ostra rywalizacja o to, kto pierwszy go znajdzie i sklonuje. Wydawało się, że właśnie to będzie nowina, na którą wszyscy czekali – coś, co pozwoli wyjaśnić wszystkie anomalie, które pojawiły się podczas pogoni za onkogenami.

Jednak choć odkrycie znacznie ograniczyło zakres poszukiwań, znalezienie genu odpowiedzialnego za siatkówczaka było nadal tytaniczną pracą, ponieważ chromosom 13 to potężna wiązka DNA, o długości około 60 mln par zasad. Co więcej, naukowcy nie byli pewni, czy poszukują pojedynczego genu, czy też większej grupy genów mogących hamować rozwój nowotworu tylko we współdziałaniu. W znalezieniu odpowiedzi pomógł im nieprawdopodobny uśmiech losu. W połowie lat 80. jednym z pracowników w centrum badawczym Boba Weinberga został młody naukowiec Steven Friend. Przybywając do laboratorium Friend ogłosił, że jego celem jest sklonowanie genu odpowiedzialnego za siatkówczaka. Weinberg opowiada, że przyjął te zapowiedzi z wielkim zaskoczeniem. „Co? Jak zamierzasz to zrobić? Przecież nie masz pojęcia o klonowaniu, a poza tym nikt dokładnie nie wie, gdzie on jest na 13 chromosomie". Jednak Friend nie dał się zniechęcić. „Nic się nie martw. Na pewno to zrobię" – powiedział.

Pełen, jak to określił Weinberg, „nieracjonalnego zapału – całkowicie nieracjonalnego i nielogicznego" Friend zabrał się

do dzieła. Nawiązał współpracę z zatrudnionym w pobliskim szpitalu Massachusetts Eye and Ear Infirmary lekarzem Tedem Dryją, który wśród swoich pacjentów miał dzieci chore na siatkówczaka. Kierowany troską o nie, ale także ciekawością i chęcią poszerzenia swojej wiedzy na temat DNA, Dryja, który nie miał za sobą żadnych szkoleń w zakresie biologii molekularnej, rozpoczął na własną rękę badania w celu wykrycia pierwotnej przyczyny tej okropnej choroby. Koncentrując się na 13 chromosomie, wyciął i sklonował niewielkie fragmenty DNA. Dla niego było to po prostu ćwiczenie i próba zdobycia nowych umiejętności, ale uzyskane klony stały się przydatnymi próbnikami, które można było wykorzystać do dalszych badań chromosomu. Dryja podzielił się nowym narzędziem z Friendem i niedługo po tym jak młody naukowiec rozpoczął swoje badania, można było powiedzieć: „trzymajcie się, bo nie uwierzycie, jeden z tych próbników wylądował w samym środku genu siatkówczaka i umożliwił jego sklonowanie". Tak relacjonuje to Weinberg swoim słuchaczom w MIT. Rozkłada ręce na całą szerokość, by podkreślić długość nici DNA, a następnie pokazuje palcem dokładnie to miejsce, w które trafił próbnik, zupełnie przypadkowo, dokładnie w punkt. Weinberg mówi powoli, pełen zachwytu. „Teraz wiecie, ile milionów par zasad mieści się w każdym chromosomie i zdajecie sobie sprawę, że był to... jest... zupełnie nieprawdopodobny zbieg okoliczności. A jednak się wydarzył. Możemy oczywiście powiedzieć, że to było kompletnie niezasłużone, ale to naprawdę fantastyczne odkrycie".

Steve Friend i Ted Dryja opisali swoje doświadczenie w artykule dla „Nature", który ukazał się w październiku 1986 roku. Tym razem świat był już gotowy i chciał słuchać. Nieco wcześniej inny uczony, Webster Cavenee, przygotowując

habilitację na Uniwersytecie Utah, zawęził zakres poszukiwań do określonego fragmentu chromosomu 13, a jego artykuł z 1983 roku był pierwszym, który potwierdził hipotezę Knudsona. Kiedy Cavenee dowiedział się o zidentyfikowaniu i sklonowaniu genu, powiedział: „Chylę czoła przed tymi facetami. Można to nazwać szczęściem, ale przecież przeprowadzili właściwe, dobrze przygotowane doświadczenie i wyszło im. Co więcej możecie zrobić, żeby przestali was nazywać szczęściarzami, a zaczęli nazywać dobrymi naukowcami?".

Również Alfred Knudson był bardzo szczęśliwy. „Jestem zachwycony, że tak się stało" – mówi. „Wcześniej mogliśmy tylko snuć teorie na temat tego, jak działa gen siatkówczaka. Teraz mamy ten gen i możemy to sprawdzić w praktyce".

Oznaczało to zmianę paradygmatu – zupełnie nowy sposób myślenia o powstawaniu nowotworów jako walce konkurujących z sobą sił onkogenów i genów supresorowych lub, jeśli posłużyć się porównaniem do samochodu, przeciwstawiania hamowaniu przyspieszania. Odkrycie potwierdziło również ostatecznie pogląd, że nowotwory są efektem mutacji. Pierwotną rolą onkogenów nie jest wywoływanie raka, a podstawową funkcją supresorów nie jest hamowanie jego rozwoju. Oba typy genów mają swoje zadania, w tym między innymi kontrolowanie procesów podziału i namnażania się komórek, w ramach nieskończonego cyklu budowania i odnawiania ludzkiego ciała. Dopiero, kiedy ulegają uszkodzeniu i przestają prawidłowo funkcjonować, zyskują zdolność wywoływania nowotworu.

Kiedy niedługo później okazało się, że p53 jest tym samym rodzajem genu, co gen siatkówczaka – supresorem i to w dodatku bardzo silnym – wiadomość ta zelektryzowała całe środowisko. Naukowcy zareagowali jak stado gołębi przywoływane przez

hodowcę – zawrócili, by polecieć we właściwym kierunku. Ci zaś, którzy zaczęli tracić wiarę w p53 i zastanawiali się nad zmianą tematu swoich badań, powrócili do pracy pełni nowego entuzjazmu.

ROZDZIAŁ 8

p53 ujawnia prawdziwe oblicze

...w którym czytamy o ciężkiej pracy i zbiegach okoliczności, które pokazały, że typ dziki p53 jest supresorem nowotworowym, a nie onkogenem – że jego zadaniem jest wciskanie hamulca w komórkach o uszkodzonym DNA.

* * *

Większość ludzi nie zdaje sobie sprawy, że w nauce dane mogą nie tylko być błędne, ale wręcz mylące. Twarde fakty nie istnieją, kiedy próbujesz coś odkryć. Dopiero później fakty stają się twarde.

Francis Crick[23]

Dowody na to, że p53 został błędnie uznany za onkogen, podczas gdy w rzeczywistości jest genem supresorowym, zaczęły się pojawiać równolegle z rozwojem badań nad genem siatkówczaka. Jednym z najważniejszych naukowców sprzeciwiających się powszechnej opinii był Bert Vogelstein, legendarna postać w historii p53. To właśnie w jego laboratorium dokonano jednego z najważniejszych odkryć dotyczących tego genu. Dlatego w pewne niewyobrażalnie gorące popołudnie w lipcu 2012 roku przybywam do Baltimore na spotkanie z nim. Rozmawiamy w jego gabinecie w eleganckim nowym biurowcu

pełnym szkła, światła i zieleni, z widokiem na oryginalne stare budynki szpitala uniwersyteckiego.

Laboratorium Vogelsteina jest znane zarówno z zamiłowania jego pracowników do ciężkiej pracy, jak i dobrej zabawy. Przez lata Bert prowadził złożony z badaczy pracujących w laboratorium zespół rockowy o nazwie Wild Type, który występował na rozmaitych konferencjach i spotkaniach naukowych. Zespół rozpadł się, kiedy żona perkusisty zmarła na białaczkę, a on został jedynym opiekunem swych dzieci. Dla ich dobra postanowił zrezygnować z występów.

„Założyliśmy zespół, żeby wzmocnić poczucie wspólnoty w laboratorium. Wszystkim się to spodobało, naukowcom też – i dla naukowców graliśmy. To była świetna zabawa!" – wspomina Vogelstein. „Myślę, że ważne jest, aby mieć jakieś zajęcie poza pracą. Ja zawsze zachęcam do tego moich współpracowników. Wielu badaczy analizujących kwestię kreatywności przyznaje, że bardzo często inspiracja przychodzi, kiedy się wyłączamy, kiedy nie skupiamy się tylko na tym, nad czym pracujemy".

Przyjeżdżam na spotkanie nieco przed czasem i czekając w holu przeglądam leżące na stoliku albumy ze zdjęciami laboratoryjnej „rodziny" Vogelsteina, ukazujące pracowników podczas spotkań towarzyskich i konferencji, a także Wild Type w czasie występów. Oprócz albumów na stoliku leży też egzemplarz książki *Grant Making for Dummies* (pol. Granty dla początkujących). Kiedy Vogelstein wyłania się ze swojego pokoju, wyciągając rękę na powitanie, jestem zaskoczona jego drobną postacią i szelmowskim uśmiechem na twarzy. Z tym uśmiechem prowadzi mnie do swojego dużego, chłodnego gabinetu i wskazuje obrotowe krzesło dla gości. Pod ścianą zauważam syntezator,

na którym, jak mówi, Vogelstein lubi sobie pobrzdąkać od czasu do czasu.

Będący już po sześćdziesiątce badacz roztacza wokół siebie aurę niewyczerpanej energii. Kiedy rozmawiamy o jego życiu i nauce, jego opowieść co chwilę przerywają wybuchy wysokiego śmiechu, brzmiącego jak skrzyżowanie radości i smutku. Vogelstein pochodzi z długiej linii rabinów – twierdzi, że w rodzinie było ich trzynastu. On sam przeciwstawił się przeznaczeniu i postawił na naukę. Badaniami nad rakiem zajął się w 1978 roku, w szczytowym okresie gorączki wywołanej odkryciem onkogenów. Założył własne laboratorium w szpitalu przy Uniwersytecie Johnsa Hopkinsa, na którym zdobył wykształcenie medyczne i pracował przez kilka lat jako lekarz. Na studiach w wolnym czasie pomagał w laboratorium Howarda Dintzisa, co uwielbiał. „Zacząłem robić badania z Howardem tylko po to, żeby się dowiedzieć, na czym to polega, a potem wracałem do tego każdego lata i w każdej wolnej chwili podczas studiów – na fakultetach, wieczorami, a nawet w weekendy. Potem nauczyłem się także leczyć pacjentów i opiekować nimi. Oba te zajęcia dawały mi wielką satysfakcję, ale uznałem, że praca badawcza bardziej mnie stymuluje intelektualnie. To był bardzo trudny wybór, ponieważ satysfakcję z leczenia pacjentów odczuwasz od razu, a satysfakcja z badań przychodzi po wielu latach, a czasem nigdy. Zajęcie się pacjentami chorymi na raka było prawdopodobnie decydującym momentem".

Pierwszym dzieckiem, które leczył Vogelstein, była zaledwie trzyletnia dziewczynka imieniem Melissa, którą rodzice przywieźli do szpitala, ponieważ była bardzo blada i cechowała ją podatność na siniaki. Vogelstein zdiagnozował u niej białaczkę. „Kiedy o tym myślę, ciągle jestem przerażony, bo moja wnuczka ma teraz

dwa i pół roku" – przerywa na chwilę, wyobrażając sobie siebie w sytuacji rodziców tamtej dziewczynki. „Nagle, bez żadnego ostrzeżenia, bum! Wczoraj wszystko było w porządku, a dzisiaj ma raka. Jej ojciec był matematykiem, mniej więcej w moim wieku. Zapytał mnie: «Dlaczego to spotkało moją córeczkę?», a ja nie umiałem mu odpowiedzieć. Patrząc racjonalnie, można by powiedzieć, że jego pytanie znaczyło: «Co się dzieje? Jakie są przyczyny tej choroby?». Jednak my nie mieliśmy pojęcia. Absolutnie żadnego. To znaczy, oczywiście istniało już wtedy ze sto teorii, tyle że i tak nie mieliśmy pojęcia... Rak to była czarna magia! Można było podać coś dziecku i niektóre z nich (a może nawet wiele) reagowały. Ale to wszystko były trucizny. To był koszmar".

Tamto doświadczenie na zawsze wryło mu się w pamięć i spowodowało, że wskazówka przechyliła się na korzyść badań naukowych. Praca dla dobra ludzkości była częścią jego rodzinnej tradycji, a poza tym Vogelstein chciał mieć swój udział w odkryciu wielkiej tajemnicy raka. Jego motywacja do walki z tą chorobą niezmiennie rosła, ponieważ jego pierwsze laboratorium znajdowało się bezpośrednio nad oddziałem radioterapii i każdego ranka w drodze do pracowni zarówno sam Vogelstein, jak i jego studenci mijali rzędy ciężko chorych pacjentów, często na wózkach inwalidzkich, którzy czekali na zabieg. Dlatego, jak powiedział, wszyscy wbiegali po schodach i od razu zabierali się do pracy.

Vogelstein planował dołączyć do poszukiwań genów, które mogły mieć udział w powstawaniu nowotworów. „Ale chciałem ich szukać u ludzi. Myślę, że wynikało to z moich doświadczeń jako lekarza. Sądziłem, że jedynym sposobem, by naprawdę zrozumieć genezę i przebieg choroby występującej u ludzi, jest

przeprowadzenie badań na ludziach". Jednak jego pomysł jednoznacznie odrzucono. Vogelstein wyjaśnia, wybuchając swoim zaraźliwym śmiechem, że nikt nie dałby na to pieniędzy. „Powiedziano mi, że jeśli chcę się dowiedzieć czegoś na temat procesów chorobowych, muszę w tym celu wykorzystać jakiś sprawdzony w doświadczeniach organizm. Oznaczało to myszy, dżdżownice albo muszki owocówki, ponieważ można nimi manipulować, hodować tkanki, czy coś takiego. Taki sposób myślenia wtedy dominował – i dominuje w dużym stopniu dziś".

Jak zatem prowadził swoje badania? „No cóż, tak naprawdę to nie wiem, jak je prowadziłem. Naprawdę nie miałem żadnego dofinansowania... Musiałem za własne pieniądze wynajmować mikroskopy. Wydawałem na to swoją pensję. Przez kilka lat byliśmy naprawdę bez grosza!".

Sponsorzy wreszcie się znaleźli, kiedy laboratorium Vogelsteina zaczęło osiągać ciekawe wyniki. Jego początkowe wysiłki koncentrowały się na „frakcjonowaniu" nowotworów, to znaczy na oddzielaniu zdrowych komórek od zmutowanych w wyhodowanej tkance tak, aby można było jednoznacznie rozróżnić DNA obecne w obu rodzajach. „Frakcjonowanie nowotworów brzmi jak coś banalnie prostego, ale tak naprawdę można o tym powiedzieć wszystko, tylko nie to, że jest banalnie proste. Wielu badaczy utknęło na tym etapie" – mówi Vogelstein. Powszechną praktyką było mielenie materiału nowotworowego na proszek przed doświadczeniami, więc częstym problemem było zanieczyszczenie krzyżowe[24]. „My robiliśmy to pod mikroskopem, przy pomocy żyletki. Zazwyczaj frakcjonowanie jednego guza trwało od czterech do pięciu godzin. Współpracował z nami patolog, Sam Hamilton. Każdego dnia

spędzaliśmy długie godziny w laboratorium patologicznym, preparując tkanki".

Po przygotowaniu narzędzi i opanowaniu sztuki oddzielania i oznaczania DNA pochodzącego z ludzkiego nowotworu jelita grubego (wybranego do badań, ponieważ można było niemal obserwować rozwój guza, który rozpoczynał się od łagodnego polipa), Vogelstein i jego zespół byli gotowi do poszukiwań genów odpowiedzialnych za powstawanie nowotworu. Wtedy właśnie poznali prawdę na temat „typu dzikiego" p53. Doszli do niej, wykorzystując ten sam sposób rozumowania co Steven Friend oraz inni badacze poszukujący genu siatkówczaka.

„Mieliśmy kawałki guzów od pacjentów chorych na raka jelit, setki przygotowanych preparatów i analizowaliśmy różnice. Widzieliśmy, że w niektórych komórkach brakuje fragmentów, a w innych całych chromosomów, ale ciągle nie potrafiliśmy wskazać onkogenów, które były za to odpowiedzialne. Pomyśleliśmy wtedy, że może te ubytki oznaczają utratę genów supresorowych. W tamtym czasie krążyła już hipoteza o istnieniu supresorów, ale nikt nie przedstawił na nią żadnych dowodów. W połowie lat 80. tak było, geny supresorowe były niczym mityczne stworzenia!".

Zadanie odnalezienia tych stworzeń otrzymała Suzy Baker, która dołączyła do zespołu Vogelsteina podczas studiów doktoranckich. Zadanie to przypominało nieco szukanie igły w stogu siana, ale Suzy zabrała się za nie umiejętnie i z entuzjazmem. Baker wiedziała, że kandydatów należy szukać w sposób podobny do tego, jak odkryto gen siatkówczaka (najczęściej nazywanego po prostu Rb od łacińskiej nazwy *retinoblastoma*). Postanowiła działać wokół miejsca na chromosomie 17, w którym brakowało jednej kopii genu,

i któremu przypisać można występowanie trzech czwartych przypadków raka jelita grubego. Jej zadaniem było przyglądanie się DNA zachowanej kopii istotnego genu, który uległ mutacji i zaczął funkcjonować nieprawidłowo, co sygnalizowało, że oba hamulce w mechanizmie przestały działać, jeden dlatego, że został całkowicie utracony, a drugi dlatego, że uległ mutacji, co jest charakterystyczną cechą supresorów nowotworowych.

Wydawało się, że to zbieg okoliczności, ale w owym miejscu na 17. parze chromosomów, pośród wielu innych genów znajdował się również p53, już wcześniej powszechnie uznany za onkogen. Ocenę tę zdawał się potwierdzać fakt, że p53 produkował bardzo dużo białek w komórkach, które badała Baker. Jednak ze względu na niedające im spokoju anomalie powtarzające się w poprzednich doświadczeniach z tym genem, Vogelstein i Baker postanowili sprawdzić go raz jeszcze, by móc go ostatecznie wyeliminować ze swoich poszukiwań. Baker starannie wybrała komórkę nowotworową, która utraciła jedną kopię p53 wraz z fragmentem chromosomu 17. Następnie wyizolowała ten gen z zachowanej kopii, sklonowała go i sekwencjonowała. W tamtym okresie było to nadal bardzo żmudne zadanie, które zajmowało kilka miesięcy. Kiedy w końcu uzyskała odczyt, była przekonana, że gen będzie normalny. Jednak, ku swojemu zdziwieniu, znalazła mutację.

„Sprawdziłam sekwencję jeszcze przynajmniej 10 razy, a potem w tajemnicy pokazałam wynik koleżance, Janice Nigro, by upewnić się, że zachowałam trzeźwą ocenę sytuacji mimo rosnącego podekscytowania" – napisała Baker w opisie swego odkrycia opublikowanym w czasopiśmie „Cell Cycle". „Wiedziałam, że dla Berta najważniejsze są logiczne argumenty i znałam jego krytyczne nastawienie do takich wyników («Jakie

jest najmniej ciekawe wyjaśnienie uzyskanych przez ciebie wyników?»), dlatego starałam się zachować całkowity spokój, kiedy weszłam do jego gabinetu i powiedziałam: «Chyba znalazłam coś ciekawego»".

Opowiadając o tamtej chwili dwadzieścia trzy lata później, Vogelstein po raz kolejny wybucha śmiechem. „To doświadczenie nie miało pokazać, że p53 tam jest. Chcieliśmy go wyeliminować, żebyśmy mogli przestać się nim przejmować i zacząć szukać prawdziwego genu supresorowego! Pamiętam to dość wyraźnie. Byliśmy wtedy na Bond Street, na tyłach supermarketu, w którym wynajmowaliśmy pomieszczenia, ponieważ nie mieliśmy swojego miejsca w szpitalu. To było całkiem fajne miejsce... W każdym razie, było piątkowe popołudnie, około trzeciej, kiedy Suzy skończyła sekwencjonowanie genu i przyszła do mnie, mówiąc: «Słuchaj, tu jest zmiana». To była drobna zmiana – o ile pamiętam zmiana C na T – a ona przeprowadziła sekwencjonowanie obu genów, zdrowego i nowotworowego, żeby się upewnić, że to mutacja somatyczna[25]. Była bardzo podekscytowana, ale ja podchodziłem do tego z większą rezerwą, ponieważ często zdarza się, że to, co początkowo uważamy za ważne odkrycie, okazuje się potem błędną interpretacją danych. Poza tym w tej sytuacji zmiana była niewielka. Spodziewaliśmy się raczej jakiejś spektakularnej mutacji. Tymczasem była to zmiana tak drobna, że można było przypuszczać, iż nie będzie miała żadnego wpływu na funkcjonowanie genu".

Vogelstein i Baker powtórzyli jeszcze wiele razy sekwencjonowanie p53 pobranego z guza tego samego pacjenta i potwierdzili, że była to nowa mutacja. Następnie zrobili to samo z komórkami nowotworowymi pochodzącymi od innych

pacjentów cierpiących na raka jelita grubego, ponownie sekwencjonując gen p53 z guzów, w których brakowało jednej kopii. I za każdym razem znajdowali to samo – pojedynczą drobną mutację genu. „Kiedy znaleźliśmy pierwszą, jeszcze wątpiłem" – wyjaśnia Vogelstein. „Kiedy znaleźliśmy mutację w drugiej próbce, poczułem ekscytację. A kiedy przebadaliśmy kolejne i zmiany były we wszystkich, zyskałem pewność. To prosta statystka... Prawdopodobieństwo, że taka sama mutacja somatyczna przypadkowo występuje w tak dużej grupie nowotworów jest minimalne – pewnie jeden do miliarda, czy coś takiego".

Dla Baker, młodej badaczki rozpoczynającej dopiero swoją karierę, było to nadzwyczajne osiągnięcie. „Moment olśnienia w przypadku takiego odkrycia zazwyczaj przedłuża się do czasu zweryfikowania i ostatecznego potwierdzenia hipotezy. Stopniowo, wraz z kolejnymi dowodami, przychodzi pewność, że masz rację i dokonałaś czegoś naprawdę niezwykłego. W moim przypadku, ponieważ byłam młodą, naiwną i pełną entuzjazmu studentką, już po znalezieniu pierwszej mutacji naprawdę wierzyłam, że oto odkryłam najważniejszy gen supresorowy w nowotworach jelita grubego. To niewiarygodne, ale okazało się, że miałam rację".

OSTRA RYWALIZACJA

Vogelstein nic o tym nie wiedział, ale w tym samym czasie Arnie Levine i Moshe Oren, pracujący niezależnie od siebie w New Jersey i Izraelu, podążali tym samym tropem. Być może pamiętacie, jak po okresie frustracji wywołanej nieudanymi badaniami nad p53 w czasie, gdy inne laboratoria z powodzeniem

tworzyły kolejne nowotwory, Levine zorientował się, że jako jedyny wykorzystywał w swoich doświadczeniach normalny, dziki typ genu, podczas gdy pozostali posługiwali się zmutowanymi klonami. Jego ulgę wywołaną wyjaśnieniem przyczyn domniemanej porażki bardzo szybko zastąpiła gorączkowa ciekawość. Niedawne odkrycie genu siatkówczaka (Rb) – pierwszego rozpoznanego supresora nowotworów – sprawiło, że zaczął się zastanawiać, czy typ dziki p53 może być takim właśnie genem. Zaczął powtarzać swoje doświadczenia z klonem typu dzikiego, które uznał wcześniej za nieudane – mieszając go z kolejnymi onkogenami, w tym również z dwoma najsilniejszymi, występującymi często w nowotworach: Myc i Ras. W każdym przypadku okazywało się, że typ dziki genu p53 zatrzymywał zmiany. „Przebijał wszystko" – opowiada Levine podczas mojej wizyty w Princeton, z przyjemnością wspominając tamte chwile. „Za każdym razem, kiedy podsuwaliśmy mu zmienioną komórkę, natychmiast ją niszczył. Wtedy po raz pierwszy przyszło nam do głowy, że mamy gen supresorowy, a nie onkogen, chociaż zachowanie zmutowanego p53 sugerowało coś zupełnie innego".

Levine opublikował swój artykuł na ten temat w magazynie „Nature" w 1989 roku, w tym samym czasie, kiedy Vogelstein i Baker wysłali swój do „Science". Jednak zanim którekolwiek z tych dwóch odkryć zostało oficjalnie ogłoszone, oba zespoły wzięły udział w konferencji w Cold Spring Harbor na obrzeżach Nowego Jorku. Każdy miał przedstawić na niej swoją prezentację. „Tuż przede mną wystąpił facet o nazwisku Bert Vogelstein. Nigdy wcześniej go nie widziałem" – wspomina Levine. „I ten facet wstaje i mówi: «Przeprowadziliśmy sekwencjonowanie genu p53 w ludzkich guzach i wyniki, które uzyskaliśmy, badając

nowotwory jelita, sugerują, że to supresor nowotworowy, a nie onkogen». Niemal spadłem z krzesła, bo miałem przemawiać zaraz po nim i zamierzałem powiedzieć mniej więcej to samo".

„Byłeś zły, bo cię ubiegł i przyćmił?" – pytam Levine'a. Pokręcił głową: „Ależ skąd, to było świetne! Spodobało mi się to z dwóch powodów. Po pierwsze, wiedziałem, że kiedy opublikuję moje odkrycie, że p53 to gen supresorowy, inni naukowcy mnie zaatakują. Bo dlaczego nie? Przez 10 lat wszyscy przekonywali w swoich artykułach, że to onkogen, prawda? W końcu to 10 lat... Wszyscy już się przyzwyczaili, że to onkogen. Dlatego jeśli ktoś twierdzi, że to jednak nie jest onkogen, to lepiej, żeby miał na twarde dowody! I nagle miałem po swojej stronie Vogelsteina. Miałem drugi wynik, potwierdzenie. To był pierwszy powód, który sprawił, że mi się to bardzo spodobało – bo jak jesteś sam, to jednak zawsze się trochę boisz, że mogłeś zrobić błąd".

„A po drugie – i to właśnie wywołało mój uśmiech – chodziło o ludzi. To właśnie w ludzkich komórkach Vogelstein to znalazł. My przez cały czas badaliśmy myszy. To znaczy, Moshe sklonował ludzki gen, ale było naprawdę mało dowodów, że p53 może mutować także u ludzi. Sądzę, że w latach 80. większość moich kolegów zastanawiała się, dlaczego SV40 nie wywoływał nowotworów u ludzi. Gdyby w tym przypadku było podobnie i mutacja p53 powodowałaby tylko nowotwory u zwierząt, to znowu byłaby swego rodzaju osobliwość, być może dająca intelektualną satysfakcję, ale bez żadnych implikacji dla ludzi".

Od czasu spotkania Orena i Levine'a w biurze tego drugiego w 1987 roku, podczas którego wyszła na jaw prawdziwa natura wykorzystywanych przez nich klonów – czyli fakt, że Levine posługiwał się typem dzikim genu, podczas gdy wszyscy inni

naukowcy wykorzystywali typy zmutowane – również Oren za wszelką cenę próbował określić rzeczywistą funkcję typu dzikiego p53. On także postanowił powtórzyć doświadczenia z rozmaitymi znanymi onkogenami, łącząc je z klonem normalnego p53 i dokładnie przeanalizować wyniki takich eksperymentów, ponieważ wiedział teraz, że „nic" znaczyło jednak „coś". Nie przyszło mu do głowy, że Levine wpadnie na taki sam pomysł i będzie prowadził takie same doświadczenia w Princeton, więc nie zdawał sobie sprawy, jak ostra jest rywalizacja.

„Badając typ dziki genu p53 otrzymaliśmy dokładnie takie same rezultaty jak Bob Weinberg w doświadczeniach z Rb. Zatrzymywaliśmy transformację i hamowaliśmy rozrost zmienionych komórek. Biorąc to pod uwagę, łatwo było wywnioskować, że zdrowy p53 zachowuje się dokładnie jak supresor nowotworowy. Jednak gdyby miało to miejsce trzy lata wcześniej – przed odkryciem Rb – szczerze wątpię, czy zinterpretowalibyśmy te badania prawidłowo".

Jak wyjaśnia Oren, w przypadku Rb, genu siatkówczaka, naukowcy wiedzieli przynajmniej, że szukają supresora, ponieważ jego istnienie można było przewidzieć na podstawie przebiegu choroby u różnych grup dzieci. Jednak w przypadku p53 nie było tak wyraźnych podstaw do przewidywania nowych modeli dla nowotworów, a jedynie garść zastanawiających anomalii, które pojawiły się podczas wcześniejszych doświadczeń z klonami. „Ogłaszanie nowatorskich koncepcji to naprawdę duże wyzwanie, ponieważ często jest tak, że robimy różne eksperymenty, a one dają nam fałszywe wyniki i w rezultacie prowadzą nas donikąd. Dlatego naprawdę potrzeba nam jakiegoś punktu zaczepienia,

żebyśmy mogli powiedzieć: „oto coś, co ma sens, bo widzieliśmy już coś takiego wcześniej i wiemy, że to prawda".

Podekscytowany osiągniętym wynikiem Oren, podobnie jak Vogelstein i Levine, wysłał artykuł do magazynu naukowego – w tym przypadku był to „Nature". Jego publikacja była jeszcze recenzowana, gdy, przypadkowo powtarzając doświadczenie Levine'a, Oren wziął udział w kameralnym warsztacie dotyczącym p53, odbywającym się w Gaithesburgu niedaleko Waszyngtonu, na którym mieli wystąpić Vogelstein i Levine. Oren nie miał pojęcia o odkryciach kolegów, więc słuchał ich prezentacji w osłupieniu. Jak później powiedział, była to dla niego chwila objawienia, ponieważ dopóki nie usłyszał o wynikach doświadczeń Vogelsteina, który badał ludzkie nowotwory, był nastawiony sceptycznie. „Wyniki, które uzyskałem były imponujące, wyraźne i jednoznaczne, ale nie byłem pewien, czy mają jakieś znaczenie kliniczne, czy też są jedynie swego rodzaju ciekawymi wynikami badań laboratoryjnych bez żadnego rzeczywistego związku z rakiem" – komentuje. „Dlatego kiedy usłyszałem, że to wszystko się łączy, doznałem olśnienia. Pomyślałem, że to najwspanialsza i najważniejsza rzecz, jaka nam się zdarzyła w związku z p53".

„Wróciłem do domu podekscytowany. Były to jeszcze czasy papierowej korespondencji. W skrzynce pocztowej czekał na mnie list z «Nature» informujący o odrzuceniu mojego artykułu". Kiedy Oren opowiada o spotkaniu w Gaithesburgu, uśmiecha się i błyszczą mu oczy. Jednak po chwili przypomina sobie ten epizod. Kręci głową i spogląda w dół, na swoje biurko, tak jakby raz jeszcze przeżywał moment, w którym zobaczył w skrzynce list, otworzył go i, dopiero co usłyszawszy potwierdzenie wartości swojego odkrycia, nie mógł uwierzyć w to, co czyta. „Byłem tak

załamany, że wyrzuciłem ten list. Ale pamiętam, że jeden z recenzentów napisał: «Oren próbuje wykorzystać koniunkturę na supresory nowotworowe. Może to dziś modne, jednak tym razem się myli. To oczywiste, że p53 jest onkogenem». Nie pamiętam jego nazwiska, ale jestem pewien, że dziś nie przyznałby się do tych słów".

Euforia, którą Oren poczuł podczas warsztatów w Gaithesburgu była porównywalna z uczuciami, towarzyszącymi mu, kiedy pięć lat wcześniej zdołał po raz pierwszy sklonować p53, dlatego rozczarowanie z powodu odrzucenia artykułu było niemal nie do zniesienia. „Rozmawiałem z Vogelsteinem przez telefon i pamiętam, że popłakałem się mówiąc mu, jakie to niesprawiedliwe".

Ostatecznie, tekst Orena został opublikowany niedługo po artykułach jego kolegów, tyle że nie w „Nature", lecz w „PNAS". Nieco później Janice Nigro, członkini zespołu Vogelsteina, która jako pierwsza widziała wyniki badań Suzy Baker, opublikowała także rezultaty własnych doświadczeń. Nigro badała przypadki innych rodzajów nowotworów, w których również występowała delecja jednego z chromosomów na 17. parze i, jak można było się spodziewać, odkryła to samo – zmutowany gen p53 w zachowanym chromosomie. Stało się jasne, że ta mutacja to zjawisko powszechne w nowotworach, nieograniczające się jedynie do guzów jelita.

Jak zauważył David Lane, wnioski zaprezentowane przez laboratorium Vogelsteina „uruchomiły lawinę". Nagle naukowcy na całym świecie zaczęli na nowo sięgać po historyczne próbki nowotworów przechowywane w szpitalnych laboratoriach, czasem jeszcze od XIX wieku. „Korzystając z dostępnych narzędzi,

można było bardzo szybko zbadać dosłownie tysiące rozmaitych guzów w poszukiwaniu mutacji. W dość intensywnym okresie, w latach 1990–91, my i nasi koledzy udowodniliśmy, że mutacje genu p53 były najczęściej występującą zmianą genetyczną w ludzkich nowotworach".

Publikacje z tamtego czasu stanowią kamienie milowe w historii badań nad p53 i nowotworami w ogóle. Nie tylko potwierdzają jednoznacznie zmianę sposobu myślenia o procesie powstawania nowotworów – wywoływanych nieprawidłowym funkcjonowaniem akceleratorów i/lub awarią hamulców w komórkach – ale również udowadniają, że p53 to naprawdę niezwykły gen. O ile w normalnych warunkach jego funkcją jest chronienie nas przed rakiem, w przypadku ponad połowy nowotworów u ludzi jest zmutowany. W niektórych rodzajach nowotworów jego mutacja występuje jeszcze częściej. Mutację genu p53 obserwuje się w 70 proc. przypadków zachorowań na raka płuc, w 60 proc. przypadków nowotworów jelita grubego, pęcherza, jajników, głowy i szyi oraz w 80 proc. przypadków zachorowań na nowotwory skóry niebędące czerniakiem. Co więcej, zamiast zostać wyeliminowanym w wyniku mutacji i całkowicie utracić swoją funkcjonalność, jak inne supresory nowotworowe (których do dziś odkryto około 30), p53 może czasami po prostu zmienić charakter, przyjmując nową rolę w mechanizmie komórki, o czym napiszę w kolejnych rozdziałach.

Jak zatem dokładnie funkcjonuje gen p53 w normalnych warunkach? I co się z nami dzieje, kiedy ulega mutacji? Właśnie tak brzmiały kolejne wielkie pytania stojące przed naukowcami.

ROZDZIAŁ 9

Główny przełącznik

...w którym odkrywamy, że działanie p53 polega na wiązaniu się z DNA w uszkodzonej komórce i przejmowaniu kontroli nad innymi genami – włączaniu ich lub wyłączaniu, w zależności od potrzeb, by zapobiec podziałowi komórki.

* * *

Wiedza nudzi prawdziwego naukowca. Tym, co go motywuje, jest świadomość niewiedzy – chęć wyjaśnienia tajemnic ujawnionych przez poprzednie odkrycia.

Matt Ridley[26]

Kolejne ważne pytania w laboratorium Vogeltsteina brzmiały: Jak działa p53 jako supresor nowotworowy? oraz: Co musi pójść nie tak, aby doszło do rozwoju nowotworu? Przez tygodnie i miesiące, które nastąpiły po odkryciu faktu, że p53 jest genem supresorowym, a nie onkogenem, Vogelsteina dręczyła jeszcze jedna niezwykle istotna kwestia. Zastanawiał się, kiedy dokładnie w procesie rozwoju nowotworu zostaje uszkodzony mechanizm białka. Zespół Vogelsteina zajmował się głównie nowotworami jelita grubego, ponieważ dysponował dużą ilością materiałów do badań. Jego członkowie dość szybko odkryli, że mutacja p53

następuje w tym samym czasie co przemiana łagodnego guza w złośliwy. Innymi słowy mutacja p53 pozwala, by stosunkowo niegroźna narośl w jelicie, czyli polip, uzłośliwiła się i zaczęła rozprzestrzeniać. Badanie guzów przed tą przemianą wykazywało nietknięty gen p53. „Podobnie wyglądało to w przypadku innych narządów" – wyjaśnia Vogelstein. „Otrzymaliśmy te same wyniki, badając na przykład mózg czy piersi...".

Jeśli chodzi o funkcjonowanie zdrowego genu, jedno z pierwszych ważnych spostrzeżeń przyszło spoza ścisłego kręgu naukowców badających p53, bo z laboratorium Carol Prives, biochemiczki z Uniwersytetu Columbia w Nowym Jorku. Prives współpracowała później z Vogelsteinem nad określeniem szczegółów, a od czasu tych badań została uznana wśród badaczy za jedną z gwiazd.

Prives urodziła się i dorastała w Montrealu, w artystycznej rodzinie. Jej rodzice, wychowani w biedzie, starali się ze wszystkich sił zapewnić swoim dzieciom możliwości, których im samym zabrakło. „Bardzo chcieli, żebym poszła do college'u, ponieważ oni nigdy nie studiowali. Poza tym moja mama uważała, że to właściwe miejsce, żeby znaleźć odpowiedniego męża!". Prives, niezwykle ujmująca osoba o ciemnych falujących włosach, śmiejących się oczach za drucianymi okularami, lekko sepleniąca, uśmiecha się na tamto wspomnienie. „To stare dzieje, ale to naprawdę był okres, w którym od kobiet oczekiwano, że ich największym zmartwieniem będzie znalezienie męża". Prives poszła na Uniwersytet McGill w Montrealu, gdzie świetnie jej szło na psychologii. Szybko jednak zdała sobie sprawę, że nastawiony na obserwację i niejednoznaczny charakter tej dziedziny nie odpowiada jej temperamentowi. Porzuciła psychologię na rzecz innego przedmiotu, biochemii, która

wymaga umiejętności dedukcji i wyciągania jednoznacznych wniosków. Doktorat robiła u urodzonego w Wielkiej Brytanii Judy Quastela, znanego z bardzo szerokich zainteresowań i prac z różnorodnych dziedzin, od bakterii gleby po plony zbóż, od chorób psychicznych po nowotwory. Przed wizytą w laboratorium Quastela, Prives nie była pewna, czy zająć się nowotworami, czy neurologią. Z typowym dla siebie dystansem opowiada, w jaki sposób ostatecznie podjęła tę decyzję.

„Juda Quastel pracował na Uniwersytecie McGill jako szef jednego z instytutów nauk biologicznych, który mieścił się w starej posiadłości przekazanej uniwersytetowi przez potomka znanej w Montrealu rodziny właścicieli domów handlowych" – mówi Prives, gdy spotykam się z nią latem 2012 roku. „To był naprawdę piękny dom. Jedno laboratorium znajdowało się w jadalni, a drugie w salonie. Na sufitach ciągle były sztukaterie i żyrandole. Pamiętam, że wyglądało to trochę dziwnie. Kiedy tam przyjechałam, gabinet [Quastela] był na drugim piętrze. Cały budynek miał dwa piętra i jestem pewna, że pomieszczenia na samej górze były pierwotnie przeznaczone dla służby – takie małe pokoiki położone wzdłuż wąskiego korytarza. Profesor Quastel zapytał: «I co chciałaby pani studiować?». «Odpowiedziałam: «Interesuje mnie rak i interesuje mnie mózg». A on na to: «To niech pani wybiera, mózg badamy na drugim piętrze, a raka na pierwszym». «Biorę raka» – odparłam". Prives wybucha śmiechem. „Tak się zaczęła moja błyskotliwa kariera – tylko dlatego, że nie chciało mi się wchodzić po schodach i pracować w malutkim pokoiku dla służby!".

Wiele lat później Prives zaangażowała się w badania nad p53. Podobnie jak w przypadku innych naukowców, było to konsekwencją jej wcześniejszych prac nad wywołującym

nowotwory małpim wirusem SV40. Po krótkim okresie pracy w Nowym Jorku, tuż po obronie pracy doktorskiej, Prives przeniosła się z rodziną – mężem i córkami bliźniaczkami – do ojczyzny męża, Izraela, gdzie spędziła siedem inspirujących lat w laboratorium Ernesta Winocoura w Instytucie Naukowym Weizmanna. Wtedy Prives po raz pierwszy miała okazję mieszkać za granicą i bardzo spodobały jej się zarówno inność kraju, jak i wyzwania intelektualne, z którymi musiała się mierzyć w pracy. „Instytut Weizmanna był wówczas jednym z najważniejszych na świecie centrów badawczych, szczególnie w naszej dziedzinie, ponieważ pracowało w nim wielu znakomitych znawców problemu SV40. Było to jedno z najlepszych laboratoriów. Sam Ernest Winocour był bardzo znanym wirusologiem i wielu naukowców przyjeżdżało do niego, by dowiedzieć się jak najwięcej o tym wirusie".

Bezpośrednio przed jej przyjazdem do Instytutu Naukowego Weizmanna pracował tam Bob Weinberg. Prives przejęła od niego pałeczkę. Weinberg odkrył matrycowe RNA – zawierające informację genetyczną poszczególnych białek – wytwarzane przez SV40. Zadaniem Prives było przekształcenie tych informacji w rzeczywiste białka w warunkach laboratoryjnych, co miało być pierwszym krokiem do wykrycia, w jaki sposób wirus zwierzęcy wywołuje nowotwór u swojego gospodarza. Po siedmiu latach pracy w Instytucie Naukowym Weizmanna wróciła do Stanów Zjednoczonych. Dostała posadę na nowojorskim Uniwersytecie Columbia. Tam właśnie po raz pierwszy zwróciła uwagę na p53.

„Ci z nas, którzy zajmowali się badaniem SV40, byli pod nieustannym wrażeniem dużego antygenu T" – wyjaśniała. „Nadal uważam, że to jedno z najbardziej niezwykłych białek,

jakie kiedykolwiek miałam okazję badać. Jest niewiarygodnie wielofunkcyjne, naprawdę wyjątkowe. Natomiast p53 było białkiem, które, jak odkryli moi koledzy, przyczepia się do dużego antygenu T, ale poza tym niewiele było o nim wiadomo". To „przyczepione" białko nie wzbudzało zbytniego zainteresowania kolegów Prives zafascynowanych dużym antygenem T. W tamtym okresie – w połowie lat 80. – większość z nich skupiła się przede wszystkim na analizowaniu, zdobytej dzięki odkryciu dużego antygenu T, wiedzy na temat mechanizmów kopiowania DNA w komórce.

Prives z ulgą zrozumiała, że oto otwierają się przed nią nowe możliwości – stosunkowo pusty obszar działania. Wcześniej, w latach 1985–86, przebywała na urlopie naukowym w trzech najważniejszych laboratoriach zajmujących się replikacją DNA z wykorzystaniem dużego antygenu T. „Wyjeżdżając, zdałam sobie sprawę, że musiałbym być szalona, żeby zacząć konkurować z tymi ludźmi" – mówi. Koncentrując się na p53 mogła robić coś swojego. Z radością podjęła nowe wyzwanie. W tamtym okresie p53 ciągle zwodził naukowców, zachowując się jak onkogen, który nie przestrzega zasad.

OWADZIE WIRUSY JAKO FABRYKI OBCYCH BIAŁEK

Oprócz tego, że zrozumiała bezsens konkurowania na danym polu bez posiadania wystarczających narzędzi, urlop naukowy Prives uświadomił jej także, że jeśli chce dobrze poznać działanie jakiegoś białka, musi mieć dostęp do odpowiednich ilości materiału [badawczego]. W tej kwestii miała trochę szczęścia, ponieważ poznała Lois Miller, specjalistkę w dziedzinie

bakulowirusów, czyli wirusów atakujących wyłącznie stawonogi – owady, pajęczaki oraz skorupiaki. Pierwsze historyczne przekazy o tych drobnych formach życia pochodzą ze starożytnych chińskich tekstów opisujących zarazy wśród jedwabników, które według relacji choroba niszczyła masowo, zmieniając gąsienice w cuchnące plamy. Bakulowirusy odegrały znaczącą rolę w upadku europejskiej branży jedwabniczej pod koniec XIX wieku, a dziś stanowią poważne zagrożenie dla masowej hodowli krewetek. Jednak od lat 80. ubiegłego wieku bakulowirusy wykorzystywane są jako narzędzie biologicznej ochrony roślin przed szkodnikami w rolnictwie. Ich potencjał jako przyjaznych dla środowiska pestycydów zainspirował naukowców także do zbadania ich struktury molekularnej oraz czynności biologicznych, co z kolei pozwoliło odkryć inną, bezcenną właściwość bakulowirusów: zdolność wytwarzania ogromnej liczby białek, w tym także białek kodowanych przez obce geny wszczepione w DNA wirusów.

„Jakoś niedługo po naszej rozmowie Lois postanowiła wyhodować bakulowirusy wytwarzające białka zarówno dużego antygenu T, jak i p53. A później hojnie nam je podarowała" – wspomina Prives. Badając wspólnie oba białka, Prives bardzo szybko dokonała ważnego odkrycia: p53 potrafiło powstrzymać duży antygen T przed uruchomieniem w komórce mechanizmu kopiowania. Opublikowała wyniki swoich badań niedługo po tym, jak odkryto, że normalną funkcją genu p53 jest hamowanie rozwoju nowotworów.

„Krótko potem odebrałam telefon od tego mężczyzny, o którym wcześniej nie słyszałam, który przedstawił się jako Bert Vogelstein i poprosił: «Czy może mi pani przesłać trochę tego białka? Chciałbym sprawdzić pewien interesujący pomysł».

Odpowiedziałam, że oczywiście. Nic o nim nie wiedziałam, ale przez telefon wydawał się bardzo miły". Później Vogelstein poprosił Prives o pomnożenie białek rozmaitych zmutowanych odmian p53, pochodzących z różnych typów nowotworów. Chciał porównać ich funkcjonowanie z zachowaniem zdrowego p53.

METODA ODCISKU STOPY[27] ODKRYWA FUNKCJĘ p53

Kiedy Vogelstein prowadził swoje badania w oddalonym o 270 km na północ Baltimore, w Nowym Jorku Prives była na najlepszej drodze do doniosłego odkrycia dotyczącego działania p53. Ostatecznie było ono wynikiem doświadczeń Jo Bargonetti, młodej adiunkt, która niedawno rozpoczęła pracę w laboratorium. Bargonetti stwierdziła, że chce się dowiedzieć dokładnie, w jaki sposób p53 blokuje działanie dużego antygenu T i uniemożliwia włączenie mechanizmu replikacji DNA w komórkach zakażonych małpim wirusem. „Próbowaliśmy ją zniechęcić, przekonywaliśmy, że to nudne i że w zasadzie już to wiemy, podpowiadaliśmy inne tematy" – wspomina Prives ze śmiechem. Ale Bargonetti się uparła. Powiedziała, że chce wykonać *footprinting*.

„Metoda odcisku stopy to rodzaj bardzo zgrabnego doświadczenia, niezbyt często przeprowadzanego przez naukowców" – wyjaśnia Prives. Polega ono na zmieszaniu w probówce oczyszczonego lub badanego białka z DNA, a następnie dodaniu do tej mieszanki enzymu. Enzym działa jak swego rodzaju chemiczne nożyczki, tnie DNA na fragmenty. Gdy białko zwiąże się z DNA w konkretnym miejscu, „nożyczki" nie są w stanie przeciąć w nim nici materiału genetycznego. Na koniec

mieszaninę przepuszcza się przez żel, który układa fragmenty DNA w „drabinę". Jeśli żadne białko nie wiąże DNA, drabina będzie nieprzerwana. Jeśli jednak białko związało DNA w danym miejscu, w drabinie pojawia się luka, jak ślad pozostawiony przez białko. „Jeśli wiesz, w jaki sposób odczytać sekwencję, patrząc na żel, będziesz mógł określić dokładnie, w którym miejscu żel wiąże DNA" – tłumaczy Prives.

Warto pokusić się o krótkie wyjaśnienie, które może pomóc zrozumieć znaczenie odkrycia Bargonetti. Mówiąc ogólnie, rolą białka, które wiąże DNA – czyli przyczepia się w określonym miejscu do podwójnej helisy genów – jest kontrolowanie ekspresji genów w tym rejonie, włączanie ich i wyłączanie w miarę potrzeb. Białka działające w taki sposób nazywamy „czynnikami transkrypcyjnymi". Można je porównać do dyrygentów kierujących poszczególnymi działaniami w komórce. Jednym z takich czynników transkrypcyjnych, znanych już wówczas, było białko dużego antygenu T, uruchamiające mechanizm replikacji DNA w komórkach zakażonych wirusem SV40. Dlatego celem eksperymentu Bargonetti było między innymi pokazanie, w jaki sposób p53 fizycznie powstrzymuje duży antygen T przed uruchomieniem tego mechanizmu. „Powiedzieliśmy jej: «W porządku, zrób to, jeśli nalegasz!»" – wspomina dalej Prives, która zostawiła wówczas młodą badaczkę samą sobie i przestała o tym myśleć.

Tyle że Bargonetti odkryła więcej, niż się spodziewała. „Pewnego dnia przyszła do mnie i powiedziała: «Wszystko działa, ale mam jeden poważny problem... sam p53 daje mi takie wzory w żelu»". Prives spojrzała na żel i od razu zdała sobie sprawę, że to wyjątkowe odkrycie. „To żaden problem. Raczej jesteś największą szczęściarą na świecie!" – powiedziała. Wyraźny – i zupełnie

niespodziewany – ślad pozostawiony przez p53 w drabinie DNA był pierwszą wskazówką tego, jak działa gen supresorowy. Okazało się, że on także jest czynnikiem transkrypcyjnym. Dziś znamy też już jego niezwykłą moc, wynikającą z usadowienia w samym centrum sieci zarządzającej sygnałami przeżycia lub śmierci w każdej komórce ludzkiego ciała.

Również Bert Vogelstein zorientował się, że p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym, choć doszedł do tego inną drogą. Pracownicy jego laboratorium zaobserwowali, że p53 jest bardzo aktywny w jądrze komórkowym – elektrowni, w której znajduje się DNA – ale nie w cytoplazmie, czyli w ciele komórki. Transkrypcja następuje tylko w jądrze i wiele białek aktywnych w tym miejscu jest zaangażowanych bezpośrednio lub pośrednio w kontrolowanie ekspresji genów. Dlatego członkowie zespołu Vogelsteina wykonywali doświadczenia, by sprawdzić, czy p53 wiąże DNA – co jest przecież cechą definiującą czynniki transkrypcyjne. Odkryli, że tak właśnie jest.

„Co również ważne w tej historii, nie tylko badaliśmy, które sekwencje DNA wiąże p53 (odkrywając przy okazji, że oprócz wiązanych sekwencji uaktywnia również *następne* geny), lecz również każdorazowo porównywaliśmy działanie typu dzikiego z typami zmutowanymi. I za każdym razem okazywało się, że białka zmutowanych genów pozbawione są zdolności wiązania DNA. Czuliśmy się ogromnie zmotywowani, bo te obserwacje potwierdzały, że jesteśmy na właściwym tropie. Klonowaliśmy [białka] i próbowaliśmy od nowa. Pozwoliło nam to jednoznacznie stwierdzić, czy mutacja zaburza funkcję białka. I okazało się, że we wszystkich przypadkach, bez wyjątku, mutacja zapobiega wiązaniu DNA. To przekonało nas – i myślę, że również cały świat – że mamy rację".

Jo Bargonetti także przeprowadzała doświadczenia z wykorzystaniem białek produkowanych przez zmutowane geny z laboratorium Vogelsteina. Chciała porównać wyniki doświadczeń z tymi prowadzonymi na typie dzikim p53. „Jo powiedziała mi: «Słuchaj, wiesz, że tylko typ dziki daje te wzory, a zmutowane geny już nie?»" – wspomina Prives, przykładając dłoń do piersi, żeby pokazać, że kiedy to usłyszała, zabrakło jej tchu. „Chyba, ach... Myślałam, że umrę i pójdę do nieba! To wszystko było takie piękne!... To znaczy, ślady wykryte przez Jo nie były duże, nie zawsze były jednoznaczne, ale jedno było pewne – typ dziki zawsze pozostawiał ślady w DNA, a zmutowane typy nigdy. To było absolutnie oczywiste".

Prives milknie na moment i dopiero po chwili kończy: „Wiesz, już wtedy miałam za sobą wieloletnie doświadczenie w pracy badawczej. Nie sądzę jednak, by cokolwiek, co zrobiłam wcześniej, miało choćby podobne znaczenie".

Prives i jej zespół powtórzyli badania, umieszczając rozmaite typy białek w kulturach komórek wyhodowanych w laboratorium. Badania potwierdziły, że białko wyprodukowane przez typ dziki genu p53 istotnie jest czynnikiem transkrypcyjnym, podczas gdy białka wyprodukowane przez zmutowane typy tego genu nimi nie są. W tym samym czasie w laboratorium Vogelsteina odkryto, że tak samo dzieje się organizmach żywych. Obie pracownie, pozostające już w bliskim kontakcie, w 1991 roku wspólnie opublikowały swoje wyniki we wpływowych magazynach „Science" oraz „Oncogene".

Ale jaki jest związek między pełnioną przez p53 funkcją głównego przełącznika a rolą, którą gen ten odgrywa w ochronie przed nowotworami? W jaki sposób włącza się sam gen

supresorowy? I na czym polega wówczas jego działanie? To właśnie były następne kwestie, którymi mieli się zająć naukowcy.

ROZDZIAŁ 10

„Strażnik genomu”

...w którym odkrywamy, że p53 chroni nas przed nowotworami, powstrzymując potencjalnie niebezpieczne komórki przed podziałem i wysyłając do nich ekipy remontowe celem naprawienia uszkodzonego DNA.

* * *

Nieustannie rozmyślam z troską o p53. Płacą mi za to. Wydaje mi się, że wszyscy jednak powinniśmy o tym myśleć, gdyż wygląda na to, że prawidłowe funkcjonowanie tego składającego się z 393 aminokwasów białka to wszystko, co chroni nas przedwczesną śmiercią na raka.

David Lane

Pierwsza, częściowa odpowiedź na pytanie, jak p53 hamuje rozwój nowotworów, była efektem badań Michaela Kastana, jednego z kolegów Vogelsteina ze szpitala Akademii Medycznej Johnsa Hopkinsa, który przed dołączeniem do zespołu badawczego pracował jako onkolog dziecięcy. „Wiele osób uważa, że leczenie dzieci chorych na raka to niewdzięczne i depresyjne zajęcie” – mówi Kastan, gdy dzwonię do niego do Karoliny Północnej, gdzie obecnie mieszka i pracuje. „Trzeba

jednak pamiętać, że dzieci reagują [na leczenie] znacznie lepiej niż dorośli. Udaje nam się wyleczyć około 80 proc. małych pacjentów chorych na raka, co jest naprawdę znakomitym wynikiem. Dzieci lepiej znoszą terapię, a przy tym można dobrze poznać zarówno samych pacjentów, jak i ich rodziny, więc jest to dla mnie ciekawsze doświadczenie – również pod względem społecznym – niż w leczenie raka u dorosłych".

Przypadkiem, który najlepiej ilustruje to interesujące dla Kastana połączenie społecznych i naukowych aspektów onkologii dziecięcej – i który przekonał go, że to odpowiednia dla niego dziedzina – była choroba Dory Squires, małej dziewczynki cierpiącej na nietypowy rodzaj zespołu Downa. Był to tak zwany „translokacyjny zespół Downa". Trzeci [dodatkowy] chromosom, a właściwie jego fragment, który u większości [osób z zespołem Downa] występuje przy 21. parze chromosomów, u Dory przemieścił się i dołączył do innego chromosomu. Kiedy Kastan, będący wówczas młodym lekarzem, poznał Dorę, miała ona trzy lata i długą onkologiczną historię.

Dora urodziła się z białaczką – co nie jest zdarzeniem bardzo niezwykłym wśród dzieci z zespołem Downa – którą, jak powiedział mi Kastan, pokonała bez leczenia. Przez dwa i pół roku czuła się świetnie, ale potem na jej twarzy pojawił się guz, gwałtownie rozwijający się mięsak. Na szczęście guz dobrze zareagował na radioterapię i znikł. Jednak, niedługo później u dziewczynki stwierdzono ostrą białaczkę szpikową, na którą była leczona, kiedy Kastan pojawił się w szpitalu.

„Gdy zacząłem pracować i usłyszałem tę historię, od razu pomyślałem: *Jak to jest, mamy tu dziewczynkę z przemieszczeniem chromosomu, która w ciągu trzech lat życia cierpiała na trzy różne nowotwory i nikt nie badał jej krwi, żeby*

się zorientować, dlaczego tak się dzieje? Historia miała miejsce jeszcze zanim usłyszeliśmy o onkogenach. Już wtedy przyszło mi do głowy, by zachować jej próbki krwi. Sądziłem, że choć nie wiemy jeszcze, czego dokładnie szukać, to pewnego dnia z pewnością będziemy potrafili sprawdzić, czy przemieszczenie [chromosomu] ma jakiś wpływ na tego typu przypadki. Uznałem, że z naukowego punktu widzenia to bardzo interesująca sprawa i czułem, że jest to pole, na którym może dojść do wielu ważnych odkryć. Z drugiej strony Dora była typowym dzieckiem z zespołem Downa. Była bardzo radosna i zawsze się cieszyła, kiedy widziała nas podczas obchodów. Jej ojciec ważył 275 kg i był zbyt ciężki, by spać na łóżku dla rodziców na oddziale, więc sypiał na podłodze obok łóżka. Kiedy podczas obchodu wchodziliśmy rano do ich pokoju, Dora siadała na jego brzuchu i wyciągała ręce do każdego z nas, żeby się przytulić. Każdy by się rozczulił na taki widok... i wtedy właśnie zdecydowałem, że zostanę onkologiem dziecięcym – z powodu Dory Squires".

Kastan połączył swoje studia medyczne z doktoratem w dziedzinie biologii molekularnej, którego tematem były reakcje komórek na uszkodzenie DNA. A kiedy po zakończeniu specjalizacji z pediatrii w szpitalu Johnsa Hopkinsa otworzył własne laboratorium – w którym na początku pracował tylko on sam i jego asystentka – by prowadzić dodatkowe badania, postanowił skoncentrować się na tym właśnie temacie. Jego codzienne doświadczenia ze szpitala przekonały go, że jest to kwestia niezwykle istotna dla biologii nowotworów i, jak mówi, od tego czasu nie stało się nic, co mogłoby zmienić jego przekonanie.

„Wiemy, że to właśnie uszkodzenie DNA jest przyczyną raka, prawda? Wiedzę tę zyskaliśmy dzięki badaniom na zwierzętach,

które poddajemy działaniu karcynogenów lub promieniowaniu, by wywołać u nich nowotwory. Wiemy o tym również na podstawie ludzkich doświadczeń – na przykład Hiroszima i Nagasaki pokazały nam, że promieniowanie powoduje raka. Wiemy o tym także z badań nad wpływem karcynogenów na środowisko, stąd przepisy regulujące sposoby utylizacji zanieczyszczeń przez przemysł chemiczny. I wreszcie pokazują nam to powtarzające się przypadki nowotworów w rodzinach, będące w większości wynikiem mutacji genów odpowiedzialnych za naprawę DNA. Wiemy zatem, że to uszkodzenie DNA jest przyczyną raka. Ale z drugiej strony wykorzystujemy również narzędzia, które uszkadzają DNA, by leczyć nowotwory. Zarówno radioterapia, jak i większość metod chemioterapii uderzają właśnie w DNA. A najpoważniejsze efekty uboczne chemioterapii, takie jak wypadanie włosów, zahamowanie czynności szpiku kostnego, mdłości i wymioty, pojawiają się, ponieważ w wyniku uszkodzenia DNA giną zdrowe komórki. Zatem z perspektywy klinicznej albo z perspektywy biologii nowotworów, uszkodzenie DNA wywołuje chorobę, uszkodzenie DNA jest metodą leczenia tej choroby i zarazem uszkodzenie DNA odpowiada ze efekty uboczne terapii... To czyni owo zjawisko niezwykle istotnym! Dla onkologa umiejętność rozpoznania i opisania sygnałów uszkodzeń genomu ma ogromne znaczenie, praktycznie w każdym aspekcie raka".

Kastan koncentrował się w swych badaniach na komórkach krwi i na zmianach, które prowadzą do wystąpienia białaczki. Właśnie dlatego, że wybrał taki rodzaj komórek, a nie komórki tworzące guzy lite czy karcyomy, przy pewnej dozie szczęścia udało mu się odkryć mechanizm działania p53, który chroni nas przed rakiem. Było to możliwe, ponieważ w odróżnieniu

od komórek karcynomy, w komórkach białaczkowych prawie nigdy nie pojawia się zmutowany typ p53. Kastan mógł zatem obserwować aktywność normalnego p53 w rozmaitych sytuacjach. Gdyby komórki zawierały zmutowany p53, nic by się nie działo. Był to swego rodzaju szczęśliwy przypadek również dlatego, że gen p53 tak naprawdę nie był przedmiotem zainteresowania Kastana, kiedy rozpoczynał on swoje badania nad uszkodzeniami i mechanizmami naprawy DNA w dzielących się komórkach.

Cykl komórkowy, jak określa się fachowo proces podziału komórki, ma kilka faz. Analizującego ów cykl Kastana zaintrygował artykuł naukowców badających zachowanie drożdży – jednego z najprostszych, najbardziej prymitywnych organizmów, składającego się z zaledwie jednej komórki. Tekst opisywał, jak drożdże, których DNA zostało uszkodzone na skutek promieniowania, zatrzymują swój cykl w „punkcie kontrolnym" do czasu naprawy DNA i dopiero wówczas kontynuują proces podziału. Autorzy artykułu zidentyfikowali gen odpowiedzialny za pełną kontrolę cyklu komórki po uszkodzeniu i to zainspirowało Kastana, by poszukać genów i białek, które pełnią tę samą funkcję w ludzkim ciele.

Zaczął od zbombardowania komórek białaczkowych promieniowaniem jonizującym – które zazwyczaj powoduje ogromne zniszczenia w DNA, ponieważ przerywa obie nici podwójnej helisy – i zarejestrowania wywołanych tym zmian w cyklu komórkowym. Zauważył, że w uszkodzonych komórkach punkty kontrolne zablokowały kolejne fazy cyklu, co sugerowało, że to, co zachodzi u drożdży, może być zjawiskiem ogólnym, występującym również w ludzkim ciele. Teraz mógł zacząć szukać odpowiedzi na pytanie, które najbardziej go nurtowało – czy

znajdzie białka, których poziom w komórce zwiększył się na skutek uszkodzenia, co wskazywałoby, że wydarzenie to aktywowało jakiś określony gen lub geny? A jeśli tak, to które z tych genów odpowiadają za zatrzymanie procesu podziału w punktach kontrolnych?

Kastan stawiał na znane onkogeny, ale ku swojemu zaskoczeniu nie zauważył zmian w żadnym z nich. Dysponował jednak niezwykle czułym narzędziem do pomiaru poziomu białek i zaobserwował podwyższone nieco wskazanie dla p53. Było to niezwykłe odkrycie, ponieważ z powodów, które wkrótce staną się jasne, poziom białka p53 w komórce jest tak niski, że zazwyczaj jest ono ledwo wykrywalne. Kastan zaczął się zastanawiać, czy owo podwyższone wskazanie może mieć jakieś znaczenie.

W rzeczy samej, miało. Jak się przekonamy, Kastan zaczął poznawać mechanizm, przy pomocy którego p53 blokuje rozwój nowotworów – zatrzymując cykl komórkowy w uszkodzonych ciałkach tak, by nie mogły się dzielić. Badacz był o krok od doniosłego odkrycia, ale musiało minąć jeszcze trochę czasu, zanim do niego doszło.

PODĄŻAJĄC ZA WSKAZÓWKAMI

W czasie, gdy Kastan przeprowadzał swoje doświadczenia, ukazał się artykuł autorstwa Stevena Frienda – naukowca, który, jak być może pamiętacie, odkrył pierwszy supresor nowotworowy, gen kontrolujący rozwój siatkówczaka nazwany Rb. W swej publikacji Friend dowodził, że jeśli zmusimy dzielącą się komórkę do nadprodukcji p53, proces podziału zatrzyma się na jakiś czas w punkcie kontrolnym o nazwie G1. Było to proste spostrzeżenie.

Friend nie wiedział, czy to się kiedykolwiek zdarzyło w prawdziwym życiu. Nie miał też pojęcia, co mogłoby spowodować nadmierną produkcję p53. Jednak czytając o tym, Kastan zaczął intensywnie myśleć. *Czy mógł to być element tego samego obrazka, który on sam dostrzegł w uszkodzonych komórkach białaczkowych? Czy promieniowanie jonizujące mogło być zdarzeniem aktywującym produkcję p53? I czy w związku z tym p53 mogłoby być białkiem odpowiedzialnym za zablokowanie podziału w punkcie kontrolnym?*

„Wtedy właśnie postanowiłem zwrócić się do Berta Vogelsteina" – opowiada. „W końcu byłem tylko lekarzem, który w wolnym czasie prowadził badania cyklu komórkowego, a Bert miał do dyspozycji całą wielką maszynerię... Pracowaliśmy w jednej instytucji, więc oczywiście wiedziałem, że udało im się sekwencjonować p53. Zadzwoniłem do niego pewnego dnia, pomiędzy wizytami kolejnych pacjentów, i powiedziałem: «Słuchaj Bert, wydaje mi się, że wiemy, jak działa p53. Czy mógłbyś dla nas przeprowadzić sekwencjonowanie tych linii komórek?»". Kastan opisał Vogelsteinowi swoje doświadczenia oraz hipotezy i wyjaśnił, że chciałby sprawdzić, w których z badanych przez niego komórek występuje typ dziki p53, a w których jego mutacje, by móc porównać ich działanie. „Bert nie uwierzył w ani jedno moje słowo!" – śmieje się Kastan. „Ale odpowiedział, że oczywiście, odczyta dla nas sekwencje. I okazało się, że w komórkach z typem dzikim p53 proces podziału został zatrzymany w punkcie kontrolnym G1, zaś tam, gdzie p53 był zmutowany, komórki dalej się dzieliły... Od razu poczułem, że to może być bardzo ważne, bo wszystkie te doświadczenia pokazywały, iż p53 odgrywa jakąś rolę w reakcji komórki na uszkodzenie DNA".

Kastan opublikował swoje odkrycia w „Cancer Research” w 1991 roku, tuż po wspólnym artykule Vogelsteina i Prives opisującym rolę p53 jako głównego przełącznika kontrolującego działanie genów. Nagle rozsypane kawałki układanki zaczęły do siebie pasować.

UKŁADANKA NABIERA KSZTAŁTU

Kolejnego elementu dostarczyła praktyka Kastana, w której zetknął się z niezwykle rzadką dziedziczną chorobą zwyrodnieniową układu nerwowego, nazywaną zespołem ataksja-teleangiektazja lub w skrócie zespołem AT. Ta wyniszczająca choroba występuje z częstotliwością od 1 na 40 tys. do 1 na 100 tys. urodzeń. Pierwsze symptomy pojawiają się we wczesnym dzieciństwie. Choroba powoli zabija komórki mózgowe i stopniowo zakłóca koordynację motoryczną pacjentów, wpływając negatywnie na wszystkie aspekty funkcjonowania, począwszy od chodzenia i utrzymywania równowagi, przez mowę, żucie [pożywienia] i przełykanie [płynów] po ruchy gałek ocznych. W wieku kilkunastu lat chorzy przykuci są już do wózka inwalidzkiego. Lecząc dzieci cierpiące na tę chorobę, Kastan wiedział, że są one szczególnie podatne na zmiany nowotworowe – ryzyko zachorowania na raka jest od 37 do 100 razy większe niż w całej populacji. Wiedział również, że tacy pacjenci są szczególnie wrażliwi na promieniowanie jonizujące, zatem w ich przypadku należy unikać takich procedur jak prześwietlenia rentgenowskie czy tomografia komputerowa. Zaczął się zastanawiać, czy oba te zjawiska mają coś wspólnego z funkcjonowaniem p53. Czy u tych pacjentów można powstrzymać cykl komórkowy w punkcie

kontrolnym G1 i uruchomić program naprawy DNA, czy też w ich przypadku mechanizm ów nie zadziała?

„Zbadaliśmy linie komórek od pacjentów chorych na AT i bardzo szybko stało się jasne, że w ich przypadku p53 nie aktywuje się normalnie" – mówi Kastan. „Nie mieliśmy pojęcia, którego genu im brakuje, ale zdaliśmy sobie sprawę, że w jakiś sposób jest on niezbędny, by uruchomić p53 po naświetlaniu".

W czasie, kiedy Kastan prowadził badania nad związkiem między AT i p53, współpracował również z Tylerem Jacksem, naukowcem z Massachusetts Institute of Technology, który stworzył eksperymentalne myszy nieposiadające genu p53. Tymocyty, czyli komórki układu odpornościowego tych myszy, po naświetlaniu nie były w stanie zahamować podziału w punkcie kontrolnym. Wspólnie z Vogelsteinem, Kastan rozpoczął współpracę również z trzecim zespołem, pracującym w Narodowym Instytucie ds. Raka w Waszyngtonie, który odkrył grupę genów nazywaną GADD, odpowiedzialnych bezpośrednio za wstrzymanie rozwoju komórek z uszkodzonym DNA (ich nazwa wywodzi się od wyrażenia Growth Arrest and DNA Damage[28]). Wszystkie trzy zespoły stwierdziły, że GADD 45 jest kontrolowany przez p53 i jest jednym z aktywowanych przez supresor genów, który zatrzymuje podział w punkcie kontrolnym G1, co wcześniej zaobserwował Kastan. Niedługo później Vogelstein odkrył jeszcze jeden gen włączony w to działanie, p21, również kontrolowany bezpośrednio przez p53.

Obraz genu p53, który wyłaniał się z tych niezależnie prowadzonych badań, ukazywał go jako główny przełącznik znajdujący się w centrum sieci przekazywania sygnału wewnątrz komórki. Jego rolą jest reagowanie na nadchodzące z zewnątrz sygnały o uszkodzeniu DNA i aktywowanie kolejnych genów,

celem zahamowania wzrostu takiej komórki do czasu podjęcia ostatecznej decyzji o jej losie. Dzięki temu groźne dla organizmu komórki z zakłóconym DNA są eliminowane.

Tak właśnie badacze opisali [aktywność p53] w swym artykule opublikowanym wspólnie w magazynie „Cell" w 1992 roku. Według słów Kastana było to „najciekawsze doświadczenie w całej jego naukowej karierze". Tuż przed ukazaniem się publikacji po raz pierwszy wziął udział w konferencji na temat p53. Zorganizowali ją w Izraelu Moshe Oren i Varda Rotter. Oren znał pierwszy artykuł Kastana na temat zatrzymania komórek w cyklu komórkowym po napromieniowaniu. Był pod tak dużym wrażeniem, że zaprosił Amerykanina do wygłoszenia wykładu podczas sesji plenarnej, czyli w obecności wszystkich czcigodnych członków społeczności badającej p53. „Najbardziej bawiło mnie to, że byłem zupełnie nieznany w tym środowisku. Przyjechałem na spotkanie, wszedłem na mównicę i opowiadałem o szlaku odpowiedzi [na uszkodzenia DNA w komórce] w tym samym dniu, w którym w 'Cell' ukazał się nasz artykuł" – wspomina Kastan. Nikt wcześniej nie widział tych danych, więc wykład wywarł na słuchaczach ogromne wrażenie.

„Byłem nikim, w zasadzie bez żadnego zaplecza" – opowiada Kastan. „Po prostu zadałem ważne pytanie, ponieważ dokładnie przeczytałem różne dostępne materiały. No i zadałem je we właściwym czasie, a szukając odpowiedzi, sięgnąłem po właściwą metodę i właściwy typ komórek".

ROZWIĄZANIE TKWI W RZADKIEJ CHOROBIE ZWYRODNIENIOWEJ

Nie wszyscy byli gotowi, by całkowicie zaakceptować hipotezę Kastana. Na tamtym etapie, w 1992 roku, najmniej jasnym ogniwem był jej związek z zespołem ataksja-teleangiektazja. Nikt nie wiedział, którego elementu brakowało pacjentom cierpiącym na tę chorobę – co czyniło ich tak wrażliwymi na promieniowanie. Naukowcy wiedzieli jedynie, że w normalnych warunkach element ten był niezbędny, by zasygnalizować genowi p53 poważne uszkodzenie DNA i aktywować cały system reagowania. Sytuacja wyjaśniła się dopiero wtedy, kiedy po okresie tytanicznej pracy ponad 30 naukowców z różnych krajów i ostrej rywalizacji między laboratoriami poszukującymi odpowiedzialnych za to genów, w 1995 roku kierowany przez Yossi'ego Shiloha zespół z uniwersytetu w Tel Awiwie ogłosił sukces.

Podczas rozmowy telefonicznej w 2012 roku Shiloh mówi mi, że jego pełne determinacji poszukiwania genu odpowiedzialnego za występowanie AT zabrały mu ponad 15 lat życia. Wszystko zaczęło się, kiedy jego mentor, profesor Maimon Cohen, zaproponował mu wyjazd do małej wioski na południu Izraela, gdzie obaj mieli się spotkać z pochodzącą z Maroka żydowską rodziną dotkniętą zespołem ataksja-teleangiektazja. Shiloh właśnie uzyskał tytuł magistra i poszukiwał tematu do swojej pracy doktorskiej. „Profesor Cohen miał ukryty cel: chciał mnie zainteresować AT" – wspomina Shiloh. „Świetnie mu się to udało, ponieważ, kiedy tylko zobaczyłem tamtych pacjentów, niemal natychmiast uznałem, że to ważny problem, którym trzeba się zająć. Po pierwsze dlatego, że to ogromna tragedia i w tamtym okresie temat zupełnie zaniedbany – nikt zbytnio nie zajmował się tymi rzadkimi chorobami o długich nazwach. Po drugie zaś wydawało mi się oczywiste, że poznanie i zrozumienie AT może

mieć znaczący wpływ na wiele różnych dziedzin medycyny: neurologię, immunologię czy genetyczne dziedziczenie skłonności do nowotworów, żeby wymienić tylko te najważniejsze. AT jest jak medyczny mikrokosmos – tak wiele obejmuje układów w ludzkim ciele".

Shiloh nie miał złudzeń i doskonale zdawał sobie sprawę, że znalezienie wspólnej przyczyny dla tak wielu różnych objawów będzie bardzo trudne. Przez wiele lat wśród naukowców zajmujących się AT panowało przekonanie, że istnieją cztery odrębne typy choroby, za które odpowiadają przynajmniej cztery różne geny. Pierwszym przełomem, który Shiloh uznaje za sygnał do rozpoczęcia rywalizacji o to, kto pierwszy zidentyfikuje te geny, było odkrycie Richarda Gattiego z Uniwersytetu Kalifornijskiego w Los Angeles, który badał społeczność amiszów z Ohio. W 1988 roku Gattiemu udało się zlokalizować gen odpowiedzialny za AT w okolicach 11. pary chromosomów. Dokonał tego, wykorzystując metodę nazywaną analizą sprzężeń genetycznych, w ramach której poszukuje się markerów genetycznych – fragmentów DNA o odmiennej „pisowni" rozsianych wzdłuż całego genomu, które powtarzają się u osób cierpiących na określoną chorobę genetyczną, a nigdy nie występują u osób zdrowych. Następnie badacze wykorzystują narzędzia statystyczne, by zasugerować, które markery są najbliższe docelowego genu. W ten sposób zawęża się obszar poszukiwań. Jednak wykrycie konkretnego genu nadal jest trudne. Przypomina szukanie domu osoby, o której wiemy jedynie, jak ma na nazwisko, czy w jakim mieście żyje. Dlatego potrzeba było kolejnych ośmiu lat, by Shiloh i jego zespół osiągnęli swój cel.

„Kiedy spoglądam wstecz, to aż sam się dziwię, że przez osiem lat cały zespół pracował nad tym jednym projektem" – mówi Shiloh. „Wiesz, naukowcy to raczej indywidualiści... Dzisiaj dalej badamy AT, ale każdy ze studentów pracujących w laboratorium prowadzi własny projekt. A w tamtym okresie całe laboratorium, kilka pokoleń studentów, doktorantów i adiunktów zajmowało się tylko wyławianiem kolejnych genów mieszczących się w tej lokalizacji chromosomu 11, klonowaniu ich i analizowaniu" – dodaje.

Dzisiaj, dzięki programowi Human Genome Project, a także dzięki ogromnej masie dostępnych danych na temat genów i istnieniu aparatów do automatycznego sekwencjonowania genów, takie ćwiczenia są stosunkowo łatwe. Jednak w połowie lat 90. ubiegłego wieku była to naprawdę ciężka i żmudna praca, której powodzenie zależało także od chęci współpracy rodzin dotkniętych chorobą. Bez ich DNA doświadczenia nie byłyby możliwe. Wśród setek genów sklonowanych przez członków zespołu Shiloha jeden szczególnie zwrócił ich uwagę, ponieważ był wyjątkowo długi – tak długi, że kilkakrotnie powtarzali klonowanie, by upewnić się, że jest prawdziwy. Z pewnością zawierał materiał do wytworzenia dużego białka, a zarazem takiego, które – jak się przekonali – miało cechy białka „sygnałowego", odpowiedzialnego za przesyłanie wiadomości wewnątrz komórki.

Shiloh dobrze pamięta dzień, w którym zorientowali się, że to jest właśnie to, czego szukają. „Miałem wtedy zajęcia na uczelni. Kiedy wróciłem do laboratorium, jedna z pracujących tam studentek podeszła do mnie z wynikiem hybrydyzacji Southerna i powiedziała coś, co pamiętam bardzo dokładnie: «W tej rodzinie coś dziwnego dzieje się z tym genem». Chodziło o jedną

z czterech palestyńskich rodzin, które obserwowaliśmy. Spojrzałem na wynik i zrozumiałem, że jej członkom brakuje dużej części tego samego genu. Było to widać bardzo wyraźnie. Poczułem, jak wali mi serce. Wziąłem głębszy oddech i odpowiedziałem najspokojniej, jak umiałem: «Rzeczywiście, wygląda to interesująco, coś w tym może być. Może powtórzysz te badania z próbkami DNA wszystkich członków rodziny, wykorzystując jeszcze dodatkowe narzędzia»".

Dziewczyna zrobiła tak, jak powiedział. Wniosek był jednoznaczny – oto zidentyfikowali gen, którego uszkodzenie było przyczyną choroby u wszystkich pacjentów cierpiących na AT znajdujących się pod obserwacją zespołu Shiloha. Naukowiec wspomina, że był to okres wielkiego napięcia. Wyścig o odkrycie genu był na finiszu i co jakiś czas słychać było pogłoski, że komuś się to udało. Pokusa, by natychmiast ogłosić wyniki badań była ogromna. Jednak Shiloh miał przeczucie, że być może tylko jeden gen – a nie cztery, jak powszechnie przypuszczano – odpowiada za wszystkie typy zespołu ataksja-teleangiektazja. Uznał, że potrzeba trochę więcej czasu, by to udowodnić. Ktoś inny mógł to zrobić szybciej, ale po długiej i burzliwej dyskusji wszyscy pracownicy laboratorium zgodzili się, żeby wstrzymać się z ogłoszeniem wyników badań do czasu potwierdzenia tej hipotezy. Był to naprawdę bardzo nerwowy okres, ale ryzyko się opłaciło. Dziś wiadomo, że zespół AT rzeczywiście wywoływany jest na skutek defektu pojedynczego genu. Międzynarodowe konsorcjum naukowców nadało mu nazwę ATM, co stanowi skrót od mutacja ataksja-teleangiektazja (ang. *ataxia telangiectasia mutated*).

Właśnie ten gen był elementem, którego brakowało w obrazie reakcji na uszkodzenie DNA zarysowanym przez Kastana.

We właściwym czasie on sam i inni naukowcy mogli już pokazać, w jaki sposób ATM, który jako pierwszy wyczuwa przerwanie nici DNA, przekazuje sygnały do p53, który z kolei wysyła odpowiednie wyłączniki genetyczne, by wstrzymały podział komórki. Był to biochemiczny dowód istnienia takiego mechanizmu, który ostatecznie przekonał wątpiących, że reakcja p53 na uszkodzenie DNA to jego najważniejsze zadanie jako genu supresorowego.

„Nie da się przecenić znaczenia osiągnięcia Yossiego, którym było sklonowanie genu odpowiedzialnego za AT" – twierdzi Kastan. „On na pewno nie będzie się tym chwalił, ale w końcu różni ludzie szukali tego genu przez 20 lat – on sam zresztą też – a jego zidentyfikowanie miało ogromny wpływ na wiele rzeczy... Tak naprawdę otworzyło przed nami całe pole badań związanych z sygnalizowaniem uszkodzeń DNA". Yossi to bardzo skrupulatny naukowiec i to właśnie jego skrupulatność doprowadziła go do tego sukcesu.

„Przyleciał do Baltimore, żeby opowiedzieć mi o swoim odkryciu. Pamiętam dokładnie, że siedzieliśmy u mnie w salonie, a Yossi powiedział: «No, to wreszcie mamy ten gen. Nazwaliśmy go ATM od mutacji ataksja-teleangiektazja». Spojrzałem na niego i odparłem: «Brzmi nieźle, ale wiesz, że w Stanach Zjednoczonych ATM znaczy coś zupełnie innego?». Wyjaśniłem mu, że tak nazywamy bankomaty, które wówczas były nowością. Twarz mu się wyciągnęła, więc szybko dodałem: «Nie martw się Yossi, ludzie będą pamiętać, że właśnie tam są największe pieniądze, na szlaku [odpowiedzi na uszkodzenia DNA]!». Okazało się, że tak właśnie było. Od tego momentu badania ruszyły lawinowo".

WIĘCEJ BODŹCÓW, WIĘCEJ REAKCJI

Naukowcy w laboratoriach na całym świecie zaczęli badać nowy model i wkrótce zaczęły się pojawiać kolejne dowody na to, że wiele różnego rodzaju uszkodzeń DNA – a także rozmaitych bardziej subtelnych zagrożeń dla [prawidłowego funkcjonowania] mechanizmów komórkowych – może wywołać reakcję p53 hamującą cykl komórkowy. Długa lista czynników obejmuje promieniowanie UV, związki chemiczne w środowisku naturalnym, aktywację onkogenów, a także naturalne procesy starzenia się czy obniżone w komórce poziomy tlenu lub substancji odżywczych takich jak glukoza. Co ważne, każdy z tych czynników ma własną, charakterystyczną ścieżkę sygnałową – poczynając od białka, które wysyła ostrzeżenie, że nie wszystko w komórce przebiega na tyle dobrze, by można było kontynuować podział, uruchamiając w ten sposób reakcję, a kończąc na rozmaitych genach aktywowanych przez p53. Wszystkie one jednak mają za zadanie nie dopuścić, by potencjalnie niebezpieczne mutacje przedostały się z jednej generacji komórek do drugiej.

Szaleństwo panujące wśród naukowców dodatkowo napędzane było odkryciem, że podobnie jak wiele bodźców może wywołać reakcję p53, tak również efekty tej reakcji mogą być różne. P53 może nie tylko chwilowo zahamować cykl podziału komórki – na czas naprawy DNA – ale może wstrzymać go na stałe, co nazywa się senescencją. W pewnych sytuacjach p53 może również kazać poważnie uszkodzonej komórce popełnić samobójstwo, co wielu naukowców uważa za najskuteczniejszy rodzaj broni, jakim dysponuje ten gen.

W lipcu 1992 roku David Lane, współodkrywca p53, zebrał wszystkie informacje zawarte w rozmaitych artykułach na ten temat i zamieścił je w syntetycznym tekście opublikowanym

w magazynie „Nature”, w którym nazwał p53 „strażnikiem genomu”. Porównał go do policjanta strzegącego naszych komórek i podejmującego działania mające na celu wyeliminowanie rozmaitych podejrzanych osobników, którzy się w nich pojawiają. Choć teza ta była zasadniczo zgodna z panującym w środowisku przekonaniem, to jednak tak kategoryczne stwierdzenie w artykule naukowym wymagało naprawdę dużej odwagi. „Wiedziałem, że w pewnym sensie wsadzam kij w mrowisko” – mówi Lane z drwiącym uśmiechem. „Zazwyczaj w artykułach naukowych pisze się, że są podstawy, by przypuszczać, iż... A ja tym razem stwierdziłem jednoznacznie, że tak to właśnie działa. W takiej sytuacji wszyscy myślą, że to dopiero jest wyzwanie! Ale czy to na pewno prawda? A może wcale nie? Do dziś nie wszyscy w to wierzą, ale przynajmniej sprowokowałem dyskusję o [działaniu] p53. Właśnie to było moim celem. Bez takich dyskusji nie ma postępu [w nauce]”.

PRZED CZASEM

W całej tej historii pojawiła się jeszcze jedna postać. Był nią młody naukowiec Warren Maltzman, który po obronie pracy doktorskiej na początku lat 80. ubiegłego wieku pracował krótko w laboratorium Arniego Levine’a, po czym przeniósł się na Uniwersytet Stanowy Rutgersa w New Jersey. Przygotowując pracę doktorską na Uniwersytecie Stanforda, Maltzman prowadził badania nad sposobami naprawy uszkodzonego DNA w komórkach, więc kiedy dołączył do zespołu Levine’a, w sposób naturalny został wciągnięty w prace nad p53. Później, na Uniwersytecie Rutgersa, Maltzman połączył oba te tematy, gdy zaobserwował, że w zdrowych, nierakowych komórkach

poddanych promieniowaniu UV (takiemu jak promieniowanie słoneczne) poziom p53 gwałtownie wzrasta. Opublikował swoje spostrzeżenia w magazynie „Molecular and Cell Biology" już w 1984 roku. „W tamtym okresie nie wiedzieliśmy, że p53 jest supresorem nowotworowym, więc nie rozumieliśmy, co oznacza wzrost jego poziomu. Dlatego powszechnie zignorowano artykuł [Maltzmana]. Gdybyśmy potraktowali go poważnie, już wtedy wiedzielibyśmy, że p53 odpowiada za reagowanie i naprawę uszkodzonego DNA. Moglibyśmy się też dowiedzieć, że uaktywnia inne geny... Ale... czas nie był odpowiedni, nikt nie był na tyle gotowy, by dostrzec w tym jakiś sens" – mówi Levine. Pomimo dobrych referencji od Levine'a, kariera naukowa Maltzmana po tym artykule załamała się i musiał poszukać pracy w przemyśle. „Źle się z tym czuję, bo on miał swój udział w naszych odkryciach, tyle że wyprzedzał swój czas... Historia nauki zna wiele takich przypadków" – przyznaje Levine.

ROZDZIAŁ 11

Jesienne liście i śmierć komórki

...w którym dowiadujemy się, że inną, skuteczniejszą metodą hamowania [rozwoju] nowotworów stosowaną przez p53 jest doprowadzanie do śmierci uszkodzonej komórki.

* * *

W nauce zdarza się co pewien czas, że jakaś koncepcja – uważana dotychczas za błędną – nagle rewolucjonizuje całą dziedzinę, lub że jakaś niejasna i lekceważona myśl staje się kluczem otwierającym zupełnie nowe obszary wiedzy.

Robert Musil[29]

Paradoksalnie jednym z najważniejszych i budzących największe zainteresowanie zagadnień w dzisiejszej biologii – nauce o życiu i żywych organizmach – jest śmierć. Ściśle mówiąc, chodzi o zaprogramowaną śmierć komórki, czyli apoptozę, która obok p53 należy do najczęściej poruszanych tematów artykułów naukowych. Nie jest to jednak śmierć, jaką wszyscy znamy – proces rozpadu i rozkładu, w którym z pękających komórek naszego ciała wylewa się ich zawartość, kolonizowana przez wydzielające zgniły zapach bakterie. Nie jest to śmierć, która powoduje, że z ran wypływa ropa. Martwicę powoduje zazwyczaj

nagły, przypadkowy uraz, a wylewająca się zawartość pękniętych komórek może uszkodzić otaczające je tkanki, wywołując stan zapalny. Apoptoza jest natomiast integralną częścią programu życia – elementem procesu recyklingu, w którym błona komórkowa pozostaje nietknięta, podczas gdy zawartość zostaje pocięta na kawałki i przepakowana, a następnie pochłonięta przez fagocyty, czyli komórki żerne układu odpornościowego, lub przez sąsiadujące komórki.

Apoptoza to proces spokojnego kurczenia się i rozpadu. Przez wiele lat interesowali się nią głównie embriolodzy i entomolodzy, ponieważ to właśnie apoptoza rzeźbi ludzkie ciało w łonie matki, usuwając błony spomiędzy palców, drążąc żyły i jelita, kształtując organy i budując mózg. To ten proces sprawia, że kijankom znikają ogony, kiedy rosną i zamieniają się w żaby. Jest również częścią większego procesu, metamorfozy, w którym gąsienica przekształca się w kokonie w motyla, a nimfa w ważkę. Tak naprawdę to entomolog Richard Lockshin ukuł termin „programowana śmierć komórki" – około dekadę wcześniej, niż naukowcy wymyślili alternatywną nazwę „apoptoza" – by podkreślić fakt, że jest to proces kontrolowany w pełni przez geny i korzystny dla organizmu, a nie wynik przypadkowego działania czynników destrukcyjnych.

Rick Lockshin był jednym z pierwszych biologów, którzy badali to zjawisko, współzałożycielem stowarzyszenia International Cell Death Society i ważną postacią w swym środowisku. Lockshin zetknął się z tematem apoptozy przez swoje zainteresowania procesem metamorfozy, które rozwijał w trakcie studiów biologicznych na Uniwersytecie Harvarda. W tamtym okresie zdarzało mu się „przesiadywać" w laboratorium entomologa Carrolla Williamsa, w którym czyścił sprzęty i pracował jako

technik laboratoryjny. „Williams był jednym z największych ekspertów w dziedzinie hormonów owadzich. Po powrocie z urlopu naukowego w Anglii wprowadził w swoim laboratorium zwyczaj popołudniowych herbatek. Dzięki temu spędzałem całe popołudnia, słuchając zafascynowany dyskusji na temat mechanizmów metamorfozy owadów" – Lockshin opowiadał w wywiadzie dla magazynu „Cell Death and Differentiation" przeprowadzonym w 2008 roku z okazji jego 70. urodzin.

Nieco później Williams został promotorem pracy doktorskiej Lockshina na temat zaprogramowanej śmierci komórek. Badania nabrały ogromnego tempa, kiedy Williams podczas wizyty w Japonii kupił po bardzo korzystnej cenie kokony ćmy z poczwarkami. Zamówił partię 20 tys. sztuk dla swojego laboratorium na Harvardzie. „Kiedy zostały dostarczone, był przerażony, ponieważ okazało się, że podczas transportu rozpoczął się proces ich metamorfozy. Wiedzieliśmy, że zaraz staną się bezużyteczne dla wszystkich oprócz mnie, pod warunkiem, że będę chciał pracować non stop. A ja chciałem. Przez chwilę miałem dużo więcej materiału, niż mi się kiedykolwiek marzyło" – wspominał dalej Lockshim.

Problem zaprogramowanej śmierci komórki zaczął przenikać do głównego nurtu biologii za sprawą pracy trzech patologów: Johna Kerra, Andrew Wyllie'go i Alastaira Currie'go, którzy spotkali się w 1971 roku w Szkocji, na Uniwersytecie Aberdeen, na którym Kerr spędzał roczny urlop naukowy z daleka od swojej rodzimej, australijskiej uczelni położonej w Brisbane. Kerra od dawna intrygowała kwestia śmierci komórek. Po raz pierwszy zetknął się z tym zjawiskiem w 1962 roku w Londynie, gdzie w ramach badań do swojego doktoratu obserwował skutki odcięcia dopływu krwi do szczurzej wątroby. W dużych

fragmentach wątroby dostrzegł jednoznaczne dowody martwicy w postaci charakterystycznego rozkładu widocznego pod mikroskopem. Jednak wpatrując się przez okular w cienkie plastry wątroby, zauważył coś więcej – pojedyncze komórki rozsiane z rzadka w żywej tkance, maleńkie okrągłe krople cytoplazmy upstrzone fragmentami DNA. To także była śmierć, ale bez rozkładu albo stanu zapalnego otaczającej tkanki. Ponieważ nie był zaznajomiony z literaturą z zakresu entomologii i biologii rozwoju, nazwał to, co zobaczył „martwicą przez obkurczanie" z powodu oczywistej roli tego zjawiska w zaniku uszkodzonej wątroby.

Po powrocie do Australii i podjęciu pracy na oddziale patologii Uniwersytetu Brisbane, Kerr kontynuował badanie tego procesu, tym razem obserwując go dokładnie pod mikroskopem elektronowym. Wkrótce zaczął analizować również inne tkanki i odkrył w nich to samo zjawisko. Najlepiej było ono widoczne w wycinkach nowotworów skóry oraz guzach innego typu. Wspólnie z kolegami doszedł do wniosku, że programowana śmierć komórek musi być odpowiedzialna za zmniejszanie się nowotworów po terapii, a czasem również za ich spontaniczne kurczenie się.

Seria rozłożonych w czasie mikrografii elektronowych opublikowana przez Kerra w prasie naukowej, zwróciła uwagę Alistaira Currie'ego, profesora patologii w Aberdeen. Currie pamiętał, że widział coś podobnego, gdy współpracował z młodym doktorantem Andrew Wyllie'em. W trakcie doświadczeń na szczurach potraktowali ich nadnercza sterydami, doprowadzając do zaniku gruczołów. Wyllie, który później odegrał znaczącą rolę w badaniach nad p53, był pod ogromnym wrażeniem i pozostawał pod wpływem energicznego i otwartego

Currie'ego od czasu, kiedy jako doktorant trafił pod jego skrzydła. Currie zmarł w 1994 roku. Dowiaduję się o nim wiele od Wyllie'ego, którego spotykam przy okazji konferencji patologów w Sheffield. „Alastair interesował się swoimi studentami i znał wszystkich po imieniu" – opowiada Wyllie. „Pamiętam, że chciał się dowiedzieć jak najwięcej o pracy każdego z nas i był bardzo zainteresowany tym, co robiłem". Kiedy siedzimy przy kawie w jednym z bocznych pokoi, Wyllie z sentymentem wspomina „zażarte dyskusje" między profesorem i jego studentami, które Currie, człowiek niezwykle inteligentny i obdarzony błyskotliwym poczuciem humoru, oczywiście uwielbiał.

Przed objęciem stanowiska w Aberdeen – które pozwoliło mu powrócić wraz z rodziną do ukochanej Szkocji – Currie był przez 3 lata szefem oddziału patologii w Imperial Cancer Research Fund w Londynie. Jednym z najważniejszych pytań, które intrygowały go od samego początku, było: Jak kurczą się nowotwory? Uznał, że, ponieważ nie ma żadnych widocznych oznak śmierci, musi to być jakiś proces „odpadania" komórek i tę właśnie kwestię pozostawił do zbadania swojemu młodemu doktorantowi.

„Zacząłem się zastanawiać, bez żadnych założeń, czy regresja nowotworów może być częścią jakiegoś szerszego procesu" – wspomina Wyllie. „Wiele z zachowań nowotworów to pewnego rodzaju karykaturalne zachowania zdrowych komórek. Zatem jeśli zdrowe komórki przechodzą cykl życia i śmierci, to może ma to coś wspólnego także z regresją nowotworów. Takie pomysły wisiały wówczas w powietrzu, ale trudno było przygotować doświadczenia, które mogłyby je zweryfikować".

Eksperymenty na szczurzych nadnerczach miały na celu zbadanie normalnych procesów fizjologicznych, ale to właśnie

w trakcie tych badań Wyllie i Currie zaobserwowali rozsiane komórki, które tak zaintrygowały Kerra. Ponieważ patolodzy z Aberdeen wykorzystywali zwykłe mikroskopy optyczne, nie byli w stanie dostrzec żadnych szczegółów. Dlatego Currie zareagował tak żywo, gdy zobaczył mikrografie Kerra, wykonane w wysokiej rozdzielczości. Udało mu się połączyć odwiedziny u mieszkającej w Australii córki z serią gościnnych wykładów na uniwersytecie w Brisbane, gdzie postanowił spotkać się z Kerrem. Podczas tego spotkania zaproponował Australijczykowi, by zbliżający się urlop naukowy spędził w Aberdeen.

„Przed wyjazdem Alastair zasugerował, bym zwrócił uwagę na bardzo ciekawe artykuły Johna Kerra zamieszczone w 'Journal of Pathology'. Muszę przyznać, że na początku nie zrozumiałem, o co mu chodzi". Wyllie, drobny Szkot w okularach, dziś prawie siedemdziesięcioletni, wybucha głośnym śmiechem, wspominając swoją pierwszą reakcję na zdarzenie, które miało być początkiem naprawdę wyjątkowego przedsięwzięcia – wspólnego projektu trzech naukowców, który doprowadził do odkrycia jednego z fundamentalnych procesów biologicznych i na zawsze zmienił sposób postrzegania nowotworów.

Po przybyciu do Aberdeen, Kerr obejrzał tkanki pobrane z nadnerczy pod mikroskopem elektronowym i potwierdził istnienie „martwicy przez obkurczanie" o cechach identycznych z tą, jaką zaobserwował podczas swoich doświadczeń w Brisbane. Wyllie zauważył to samo zjawisko w nowotworach piersi u szczurów. Guzy kurczyły się po usunięciu szczurom jajników, dostarczających im niezbędnych do rozwoju hormonów. Słysząc o doświadczeniach trzech naukowców, Allison Crawford, koleżanka, specjalistka w dziedzinie biologii rozwojowej, która również pisała pracę doktorską na oddziale patologii w Aberdeen,

pokazała im liczne publikacje dotyczące programowanej śmierci komórek w rozwijających się embrionach. Żaden z nich wcześniej nie zdawał sobie sprawy z bogactwa zgromadzonej wiedzy. Przykład ten świetnie ilustruje, jak bardzo skupieni na swojej dziedzinie i ograniczeni w swych zainteresowaniach badawczych bywają naukowcy. Stało się jasne, że zjawisko, które badacze ci obserwowali w rozmaitych tkankach i w różnych warunkach, zarówno normalnych, jak patologicznych, jest w rzeczywistości naturalnym procesem odgrywającym istotną rolę w wielu aspektach życia – w procesie mitozy, którego jest niezbędnym elementem, czy też w regulowaniu populacji komórek w organizmie przez eliminację starych, uszkodzonych lub nadmiarowych komórek, gdy wciąż produkowane są nowe.

Według Wyllie'ego, Currie nie był przekonany do nazwy „martwica przez obkurczanie", ponieważ nie oddawała ona tego, co różni ów proces od procesu rozkładu. Z kolei określenie „programowana śmierć komórki" zdawało się sugerować, że jest to jedynie zjawisko rozwojowe i nic więcej. „Bez wątpienia John jako pierwszy opisał to zjawisko i jako pierwszy prawidłowo je przeanalizował. Ale wydaje mi się, że pomysłem Alastaira było podkreślenie tych cech procesu, które odróżniały go od martwicy" – wyjaśnia Wyllie. „I wtedy doszło do zabawnej sytuacji. Myślę, że to się mogło zdarzyć tylko w takim miejscu jak Aberdeen: mały uniwersytet, jeden towarzyski uczony spotyka innych przy obiedzie... Alastair spotkał profesora starożytnej greki i łaciny Jamesa Cormacka i poprosił go o jakąś propozycję nazwy. Dodał, że nie byłoby źle, gdyby ta nazwa rymowała się z określeniem «mitoza»". Cormack zaproponował termin «apoptoza». Słowo to pochodziło ze starożytnej greckiej poezji i opisywało zjawisko opadania jesiennych liści. Poza tym zostało już wcześniej

wykorzystane w kontekście medycznym – 2 tys. lat wcześniej starożytny grecki lekarz Galen używał go, mówiąc o usuwaniu strupów.

Kerr, Wyllie i Currie ogłosili tę nazwę światu w sierpniu 1972 roku w magazynie „British Journal of Cancer". Ich artykuł, zatytułowany „Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics" okazał się jednym z częściej cytowanych w literaturze naukowej w późniejszych latach, jednak w chwili publikacji został przyjęty z zadziwiającą obojętnością. „Przepadł, jak kamień w wodę" – wspomina Wyllie ze śmiechem. „A niedługo później, bo w świątecznym numerze, magazyn «Lancet» zamieścił krzyżówkę, w którym jedno z haseł brzmiało: co to jest apoptoza? Byliśmy pośmiewiskiem wśród biologów! «Patrzcie, ci goście badają śmierć, ha, ha, ha!»".

Nie zniechęciło to jednak trójki naukowców i wspólnie z grupą odważnych kolegów, którzy nie obawiali się, że zostaną wyśmiani, postanowili wyruszyć w nieznane obszary, by zrozumieć mechanizmy apoptozy i spróbować stopniowo obalić obowiązujący wśród badaczy nowotworów pogląd, że jedynym motorem rozwoju raka jest niekontrolowany podział komórek. Jednak dopiero odkrycie związku między metodami reagowania p53 na uszkodzenia DNA a apoptozą czy też „samobójstwem komórki" – do którego doszło wiele lat później, przekonało sceptyków o tym, jak wielkie jest znacznie tego zjawiska. Zrewolucjonizowało to sposób myślenia o nowotworach.

Do tamtej pory dominowało przekonanie, że rak to choroba bezładnego wzrostu. Apoptoza sugerowała, że obok niekontrolowanej proliferacji istnieje jeszcze model komplementarny, w którym dzielące się w normalnym tempie

komórki nie obumierają we właściwym czasie. Aby to zilustrować, można posłużyć się metaforą wody w wannie. Można sprawić, że woda zacznie przelewać się z wanny, zarówno odkręcając kurek do samego końca – by napływała szybciej niż mogłaby odpłynąć (proliferacja), jak również zatykając odpływ – by niemożliwe było jej spływanie (blokowanie śmierci komórek). Obie metody prowadzą do tego samego skutku.

Podobnie jak w przypadku wielu innych odkryć naukowych, także w okolicznościach związanych ze zmianą postrzegania nowotworów istotną rolę odegrał ślepy traf. (Przypomnijcie sobie choćby penicylinę i niewielkie naczynie z wyhodowaną kulturą bakterii, które Aleksander Fleming przypadkowo pozostawił na stole w laboratorium, dopuszczając w ten sposób do zanieczyszczenia bakteriobójczą pleśnią). Do takiego zdarzenia doszło w pracowni Moshe Orena, w Izraelu w 1990 roku. Oren i jego zespół badali zachowanie zmutowanych genów p53 uznawanych za onkogeny, próbując określić, w jaki sposób przyczyniają się one do uzłośliwienia [komórek], kiedy poproszono ich o przeniesienie laboratorium na wyższe piętro w Instytucie Naukowym Weizmanna. Ponieważ nie mieli dużo sprzętu, poszło im sprawnie. Szybko udało im się ponownie uruchomić wszystkie urządzenia w nowych pomieszczeniach. Od razu powrócili do przerwanych doświadczeń. Zauważyli jednak, że komórki w jednym z przeniesionych inkubatorów nie dzieliły się już tak intensywnie jak w poprzednim laboratorium albo jak w sąsiednim inkubatorze (choć w obu panowały identyczne warunki i temperatura 37°C). Jaka była tego przyczyna? Jakikolwiek problem z podziałem komórek jest złą nowiną dla każdego laboratorium – oznacza, że wkrótce nie będzie czego badać. Zespół Orena próbował wszystkich znanych

sztuczek, takich jak zmiana środowiska kultur w naczyniach, by pobudzić do życia ospałe ciałka. „Po dwóch miesiącach bezskutecznych prób i stosowania różnych metod, zaczęliśmy się wreszcie zastanawiać, co złego się dzieje" – Oren wspomina podczas naszego spotkania w Instytucie Naukowym Weizmanna. „Wiedzieliśmy, że problem dotyczy tylko niektórych komórek i tylko w jednym inkubatorze. Kiedy zbadaliśmy sprawę dokładniej, okazało się, że chodziło wyłącznie o komórki, których gen posiadał konkretną mutację". Członkowie zespołu doszli do wniosku, że przyczyn problemu należy szukać w ustawieniach inkubatora, więc zdecydowali, by raz jeszcze sprawdzić temperaturę. „Było mi trochę wstyd, że nie zrobiliśmy tego wcześniej. Kiedy jeszcze byłem studentem, mój profesor poradził mi, żebym zawsze trzymał w inkubatorze butelkę wody z włożonym do niej termometrem, żebym nie ufał tylko cyfrowym wyświetlaczom. Zrobiliśmy to, co radził mój profesor i okazało się, że temperatura w inkubatorze wynosi 33,5°C, a nie 37°C".

Ktoś najprawdopodobniej uszkodził termostat w czasie przeprowadzki i w ten sposób ujawnił pewną niezwykle istotną cechę zmutowanych genów – ich wrażliwość na temperaturę. Choć odkrycie i sprawdzenie pełnych implikacji tej cechy zajęło trochę czasu, Oren ostatecznie stwierdził, że konkretna mutacja p53 w temperaturze 37°C – a więc w temperaturze, w której wykonywano doświadczenia w laboratoriach – zachowuje się jak onkogen, natomiast w temperaturze niższej niż 34°C funkcjonuje jak supresor nowotworowy, czyli dokładnie tak, jak niezmutowany typ dziki genu.

Oren znał potencjał wrażliwych na temperaturę mutacji z badań nad wirusami i wiedział, że mutacja, na którą się natknął

– tym razem w genach ssaków, a nie wirusów – to bardzo cenne narzędzie, potencjalna kopalnia złota dla badań nad p53. Naukowcy mogli wprowadzić zmutowany gen do różnego rodzaju komórek i obserwować jego zachowanie, najpierw jako onkogenu, wspomagającego uzłośliwienie komórek, a później, po obniżeniu temperatury w inkubatorze, sprawdzać, jak komórki nowotworowe zareagują na obecność dzikiego typu p53, kiedy gen zmieni swój charakter. Co więcej, mogli śledzić tę reakcję praktycznie od pierwszej minuty.

Oren i jego zespół przetestowali zmutowane geny w rozmaitych komórkach i zaobserwowali, że w obniżonej temperaturze, kiedy gen zachowywał się jak typ dziki p53, hamował podział uszkodzonych komórek. W tamtym czasie nie było to już nowe odkrycie, ale potwierdzało wcześniejsze wyniki. Badaczy szczególnie interesowało, co się stanie w komórkach białaczkowych myszy, w których zazwyczaj w ogóle nie występuje aktywny p53, kiedy sprowokują gen do zachowań charakterystycznych dla typu dzikiego. Dlatego wprowadzili zmutowany gen do kultur komórkowych podarowanych im przez Leo Sachsa, specjalizującego się w białaczkach pracownika innego laboratorium w Instytucie Naukowym Weizmanna, i obniżyli temperaturę w inkubatorze do 32°C.

Adiunkt naukowa, która wykonywała to doświadczenie, miała nadzieję, że jego wynik będzie interesujący, jednak kiedy wróciła, żeby sprawdzić, co dzieje się z komórkami, ku swojemu zaskoczeniu odkryła, że są martwe. „Zazwyczaj, kiedy widzisz martwe komórki, nie przychodzą ci do głowy żadne interesujące możliwości" – komentuje Oren. „Myślisz raczej, że zrobiłeś coś nie tak i to oznacza, że po prostu musisz jeszcze raz zrobić doświadczenie. I to właśnie zrobiła owa adiunkt. Zresztą z tym

samym skutkiem... Po dwóch tygodniach powtarzania doświadczenia byliśmy pewni, że wykonujemy je całkowicie prawidłowo, że komórki po prostu umierają".

Oren szybko zdał sobie sprawę, że to interesująca i ważna obserwacja, choć nie bardzo wiedział, jak ją zinterpretować. Zabrał więc ze sobą dane i poszedł na drugi koniec korytarza, by skonsultować je z Leo Sachsem. Sachs zasugerował, że może to być apoptoza – proces, o którym Oren nigdy wcześniej nie słyszał – i zaproponował przejrzenie nielicznych jeszcze wówczas publikacji na ten temat, w tym artykułów autorstwa Kerra, Wyllie'ego i Currie'ego. Zaintrygowany lekturą Oren zafarbował martwe komórki w szalkach, by można je było wyróżnić wśród innych, i umieścił pod mikroskopem. Wyglądały dokładnie tak, jak na zdjęciach ilustrujących apoptozę. Zespół przeprowadził jeszcze dodatkowe doświadczenia i wszystkie one prowadziły do jednego wniosku: „P53 niszczył komórki rakowe właśnie na drodze apoptozy. Byliśmy tym odkryciem bardzo podekscytowani".

Oren chciał się podzielić nową wiedzą ze swoim starym przyjacielem i mentorem Arniem Levine'em. Levine wspomina o tym, uśmiechając się z lekkim zawstydzeniem, gdy odwiedzam go w Princeton. Badacze spotkali się przy okazji konferencji w Wiedniu w kwietniu 1991 roku. Oren po raz pierwszy prezentował tam swoje odkrycia na forum publicznym. „Muszę przyznać, że pomyliłem się wtedy w ocenie" – powiedział Levine. „Jesteśmy sobie bardzo bliscy, ponieważ Moshe robił u mnie habilitację. Dlatego [w trakcie konferencji w Wiedniu] podszedł do mnie, pokazał mi dane dotyczące apoptozy i zapytał: «No, i co o tym myślisz. Niezła historia, nie?». Ale ja odpowiedziałem: «Nie sądzę, że to może dokądś doprowadzić». Moshe spojrzał

na mnie wymownie. Wiedziałem, że nie tego się po mnie spodziewał. Ponieważ to świetny facet, zaczął wyjaśniać mi po kolei, że to bardzo ważne odkrycie, dlaczego jest takie istotne, jaki wpływ może mieć na dalsze badania, i tak dalej. A mnie do dziś śmieszy, kiedy przypomnę sobie, że moją pierwszą reakcją było: «Nie rozumiem, dlaczego to miałoby być dla kogoś ważne»".

„Ta historia pokazuje, że kurczowo trzymamy się swoich poglądów. Mogłoby się wydawać, że naukowcy są zawsze otwarci na nowe koncepcje, jednak prawda jest taka, że często przywiązujemy się do jakiegoś pomysłu, koncentrujemy na nim i za wszelką cenę staramy się uzyskać dla niego potwierdzenie. Ale w ten sposób można łatwo wykluczyć inne pomysły, prawda? Tak właśnie bywa w życiu. Tak też jest w świecie nauki". (Pokazuje to również, jak silny był opór przed uznaniem, że śmierć może być tematem badań biologów. Jeszcze 20 lat po ukazaniu się artykułu Kerra, Wyllie'ego i Currie'ego na temat apoptozy, całkiem spora grupa naukowców, nawet bardzo wybitnych, była gotowa odrzucić jego tezy).

Zespół Orena jako pierwszy pokazał, że p53 może kierować komórkę na drogę apoptozy, jednak zarówno środowisko ich badań, jak i sposób aktywacji p53 były sztuczne. Dlatego ich odkrycie zrodziło kolejne ważne pytanie: kiedy i gdzie może to nastąpić w prawdziwym życiu? Już wówczas odpowiedzi na nie poszukiwali naukowcy z obu stron Atlantyku, badający transgeniczne myszy.

ROZDZIAŁ 12

Myszy i ludzie

...w którym czytamy o doświadczeniach na genetycznie modyfikowanych myszach, których celem było porównanie rzeczywistej aktywności p53 z wynikami doświadczeń na sztucznych kulturach na szalkach Petriego. Dowiadujemy się też, że można uniknąć przykrych skutków ubocznych konwencjonalnej chemio- i radioterapii.

* * *

Nauka jest beznadziejnie oportunistyczna. Podąża tylko ścieżkami otwieranymi przez technologię.

Horace Freeland Judson

W długiej historii p53, wielkie ilości danych pochodziły z badań prowadzonych na małych fragmentach tanek i zlepków komórek znajdujących się w probówkach oraz na szalkach Petriego. Były to materiały opracowywane i przechowywane w ściśle kontrolowanych warunkach laboratoryjnych. „Takie modele doświadczalne są proste i wygodne, ale to nie jest prawdziwy świat" – ostrzega David Lane. „Im więcej przyglądam się p53, tym bardziej zdaję sobie sprawę, że w prawdziwym świecie operuje on na zupełnie innym poziomie i w zupełnie inny sposób". Jak

mówi Lane, sama kultura tkankowa wywołuje stres w komórce i alarmuje p53, więc zamiast badać różnice między aktywnym i nieaktywnym białkiem, naukowcy najczęściej analizują różnice między białkiem słabo aktywnym i bardzo aktywnym. Już w doświadczeniach z wykorzystaniem zwierząt sytuacja jest zupełnie inna, bardziej zniuansowana.

Właśnie chęć poznania tych odmienności [funkcjonowania p53 w różnych warunkach] doprowadziła do kilku – dziś już anegdotycznych – wydarzeń, jakie miały miejsce podczas badań nad p53. Uczestnikami jednego z nich byli David Lane oraz jego przyjaciel i współpracownik Peter Hall. Był rok 1992. Obaj pracowali wówczas na Uniwersytecie Dundee. Historia głosi, że naukowcy spotkali się po pracy w lokalnym pubie, by przy szklance piwa raz jeszcze zastanowić się, czy gen p53 w naturalnych warunkach reaguje na bodźce i stres komórkowy tak samo jak w kulturach wyhodowanych w laboratorium. Wiedzieli, że inni również poszukują odpowiedzi na to pytanie i że rywalizacja robi się coraz ostrzejsza. Wiedzieli też, że będą musieli przygotować stertę dokumentów, by uzyskać pozwolenie ministerstwa spraw wewnętrznych na prowadzenie doświadczeń na zwierzętach. Perspektywa przejścia całej procedury, a także świadomość spowodowanych nią opóźnień, budziły w nich irytację. Wtedy Hall zaproponował, że przecież mogliby spróbować doświadczeń na sobie. Opowiadając mi tę historie wiele lat później, Hall z charakterystyczną dla siebie dezynwolturą wyjaśnia, że obaj z Lane'em zdawali sobie sprawę, iż omijając oficjalną procedurę, narażają się na gniew władz. Byli jednak zbyt podekscytowani, żeby się tym przejmować.

W ramach eksperymentu poddali rękę Halla naświetlaniu lampą słoneczną – „odpowiednik 20 minut na greckiej plaży".

Pobrali z niej też w odpowiednich odstępach czasu kilka wycinków skóry, by móc porównać aktywność p53. „Uznaliśmy, że jeśli ten gen reaguje na bodźce i stres w organizmie, to powinniśmy zaobserwować nagromadzenie białek w komórkach napromieniowanej skóry. I dokładnie to ujrzeliśmy" – opowiada Hall, podwijając rękaw koszuli i pokazując blizny. „Przeprowadziliśmy doświadczenie na mnie, bo chcieliśmy szybko uzyskać wyniki... Wszystkie rany [po wycinkach skóry] oczywiście uległy zakażeniu, ale eksperyment się powiódł i posunęliśmy się znacząco do przodu" – śmieje się.

Tego rodzaju nietypowe eksperymenty, niezależnie od doświadczeń na drożdżach, dżdżownicach czy muszkach owocowych powiedziały badaczom bardzo wiele o działaniu komórek. Jednak prawdziwym źródłem wiedzy na temat funkcjonowania bardziej skomplikowanych organizmów, takich jak ludzie – posiadających szkielet, krwiobieg oraz układ odpornościowy – były doświadczenia na myszach. Myszy mają, podobnie jak ludzie, około 23 tys. genów, z których większość ma odpowiedniki w naszym DNA. Poza tym, myszy są tanie w utrzymaniu i rozmnażają się co dziewięć tygodni, a manipulowanie ich genomem jest stosunkowo proste.

Przez dziesięciolecia naukowcy stosowali wybrane metody rozmnażania, by uzyskać zwierzęta o pożądanych cechach genetycznych. Czasem też niszczyli ich DNA znanymi związkami chemicznymi, by wywołać określone mutacje. Proces ten nazywany jest „chemiczną mutagenezą". Aż wreszcie w 1989 roku pojawiła się pierwsza mysz transgeniczna, stworzona przy pomocy zaawansowanej technologii o nazwie „rekombinacja homologiczna". Takie myszy stały się „precyzyjnymi narzędziami". Zmieniły wszystko [w świecie badań]. Opracowanie rekombinacji

homologicznej zapewniło jej autorom, pracującym w Stanach Zjednoczonych Mario Capecchiemu i Oliverowi Smithiesowi, Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny w 2007 roku. Podzielili się nią z Brytyjczykiem Martinem Evansem – jako pierwszy wyizolował on zarodkowe komórki macierzyste, z których powstają transgeniczne myszy.

Evans przyjechał do Whitehead Institute w Cambridge, w stanie Massachusetts, by poznać najnowsze rozwiązania technologiczne i nauczyć się je stosować. Ponieważ miał do wykorzystania jedynie miesiąc, starał się unikać wszelkich aktywności, które odwracałyby jego uwagę od pracy, również takich jak wykłady czy spotkania naukowe. Nie chciał nawet rozmawiać z nikim spoza laboratorium. Aż pewnego dnia odebrał telefon od Smithiesa, innego Brytyjczyka, który przeniósł się do Stanów kilka lat wcześniej. Smithies bardzo chciał dowiedzieć się czegoś więcej o wyizolowanych przez Evansa zarodkowych komórkach macierzystych, które mogły być niezwykle istotne dla jego własnych badań. „Pamiętam do dziś, że powiedziałem mu: «Oliver, jesteś jedyną osobą, z którą się tutaj spotykam...»" – wspominał Evans w rozmowie z przedstawicielem Komitetu Noblowskiego. I w następny weekend zjawił się w domu Smithiesa z termosem pełnym komórek macierzystych.

Rekombinacja homologiczna – nazywana czasem także rekombinacją ukierunkowaną – wykorzystuje naturalną skłonność komórki do uzupełniania luk w DNA przez wstawianie w nie maleńkich pasujących fragmentów DNA pobranych z innego chromosomu. Podczas ukierunkowanej rekombinacji naukowcy wszczepiają do komórki fragmenty obcego DNA, zawierające pożądane geny, licząc na to, że znajdą one odpowiednie miejsce (o pasującej sekwencji genów), w którym

będą mogły dołączyć do DNA gospodarza, zmieniając jego oryginalną sekwencję.

Przez dziesięciolecia dzięki tej metodzie stworzono tysiące myszy tak zmodyfikowanych, aby odwzorować uwarunkowania ludzkiego organizmu oraz choroby, na jakie zapada – począwszy od raka, cukrzycy czy mukowiscydozy, przez ślepotę, otyłość aż po alkoholizm. W rzeczy samej, tworzenie transgenicznych myszy stało się możliwe w warunkach niemal domowych, jak powiedział w swojej mowie noblowskiej Mario Capecchi. W dużej mierze zawdzięczamy to jego uporowi. Kiedy w 1980 roku zwrócił się do Narodowych Instytutów Zdrowia z wnioskiem o finansowanie badań nad opracowaniem nowej technologii, otrzymał odpowiedź odmowną. Usłyszał, że ma niewielkie szanse zastosowania jej w komórkach ssaków i że powinien zrezygnować z dalszych prac. Przekonany, że to on ma rację, Capecchi zignorował tę radę i niedługo później całe jego laboratorium zajmowało się tym projektem. Kiedy cztery lata później okazało się, że próby na komórkach ssaków są udane, raz jeszcze wystąpił o dofinansowanie, do tego samego departamentu Narodowych Instytutów Zdrowia. Tym razem otrzymał wsparcie, a urzędnicy Instytutu napisali w decyzji akceptującej wniosek: „Cieszymy się bardzo, że nie posłuchał Pan naszej rady".

MARIO CAPECCHI I ZNOKAUTOWANA MYSZ

W badaniach nad genem p53 jednym z najbardziej wartościowych modeli transgenicznych jest tak zwana znokautowana mysz [ang. *knock-out*], czyli zwierzę, z którego DNA usuwa się określony gen, by sprawdzić, jak będzie bez niego

funkcjonować. Choć wszyscy trzej laureaci Nagrody Nobla nazywani są „ojcami myszy transgenicznych”[30], to jednak zwierzęta typu znokautowanego, stworzone przy pomocy zmodyfikowanej technologii rekombinacji ukierunkowanej, są owocem wyobraźni Maria Capecchiego. Jego droga na szczyty nauki pokazuje, że życie pisze czasem historie, których nie wymyśliłby żaden literat. Capecchi jako dziecko mieszkał na ulicy w spustoszonych wojną Włoszech, a do szkoły poszedł dopiero w wieku dziewięciu lat.

Urodził się w Weronie w 1937 roku. Jak napisał w swojej nocie biograficznej dla Komitetu Noblowskiego, był to okres, kiedy w kraju szalały faszyzm, nazizm i komunizm. „Moja matka Lucy Ramberg była poetką, a ojciec Luciano Capecchi oficerem włoskiego lotnictwa. Przeżyli szalony romans, ale moja matka mądrze zdecydowała, by nie wychodzić za niego za mąż”.

Matka Capecchiego studiowała na Sorbonie, gdzie zaangażowała się w działalność polityczną. Dołączyła do cyganerii, grupy poetów otwarcie przeciwstawiających się faszyzmowi. W październiku 1937 roku, po powrocie do Włoch, urodziła Mario. Ostatecznie zamieszkali w niewielkim domu w Alpach Tyrolskich. Obawiając się, że jej działalność może ściągnąć na rodzinę niebezpieczeństwo, zaczęła oszczędzać pieniądze. Chciała móc zostawić je sąsiadom – chłopskiej rodzinie – gdyby okazało się, że zostanie aresztowana i będzie musiała prosić ich o opiekę nad synem.

„Wiosną 1941 roku niemieccy żołnierze przyszli do naszego domu i aresztowali matkę. To jedno z moich najwcześniejszych wspomnień” – napisał Capecchi. „Matka uczyła mnie mówić po włosku i po niemiecku, więc zdawałem sobie sprawę z tego, co się dzieje. Czułem, że nie zobaczę jej bardzo długo, o ile

w ogóle". W wieku trzech i pół roku [Capecchi] przeniósł się do sąsiadów i zaczął wieść proste wiejskie życie. „Późną jesienią, po winobraniu, zebrane owoce wrzucano do ogromnych drewnianych kadzi. My, dzieci, rozbieraliśmy się i wskakiwaliśmy do tych kadzi, w których deptaliśmy i ugniataliśmy winogrona. Byliśmy piszczącą masą purpurowej energii. Do dziś pamiętam ostry zapach i smak świeżych winogron".

Capecchi pamięta również dzień, w którym amerykańskie samoloty przeleciały nad polami „bezmyślnie" strzelając do okolicznych mieszkańców. Nie pamięta za to, jak i kiedy skończyły się pieniądze pozostawione przez jego matkę, a tylko tyle, że w wieku czterech i pół roku musiał opuścić gospodarstwo. „I tak zostałem sam" – napisał w nocie. „Wyruszyłem na południe, czasem śpiąc na ulicy, czasem przyłączając się do gangów lub innych bezdomnych dzieci, czasem mieszkając w sierocińcach, prawie zawsze głodny. Moje wspomnienia z tych czterech lat są wciąż bardzo żywe... Niektóre z nich są niewyobrażalnie okrutne, inne trochę przyjemniejsze".

Matka Capecchiego przeżyła uwięzienie w niemieckim obozie i po długich poszukiwaniach odnalazła syna w październiku 1946 roku, w ponurym szpitalu w prowincji Reggio Emilia, w którym znalazł się z powodu niedożywienia i tyfusu. Razem wyjechali do Stanów Zjednoczonych, do młodszego brata Lucy, Edwarda Ramberga, który mieszkał ze swą żoną Sarah w Pensylwanii. Sarah nauczyła małego Mario czytać oraz pisać i chłopiec po raz pierwszy w życiu poszedł do szkoły. Jego wujek Edward był fizykiem, znanym z udziału w skonstruowaniu pierwszych mikroskopów elektronowych, więc Capecchi, idąc do college'u, wybrał fizykę i matematykę. Choć czuł, że studia rozwijają go intelektualnie, oba przedmioty wydawały mu się za bardzo

osadzone w przeszłości. Tymczasem on potrzebował nowych wyzwań i „nauki, która pozwoli niezależnemu badaczowi osobiście i bezpośrednio zaangażować się w prowadzane eksperymenty".

To, czego szukał, znalazł podczas trzymiesięcznego kursu w Massachusetts Institute of Technology (MIT). Były późne lata 50. „Tam właśnie po raz pierwszy zetknąłem się z biologią molekularną, dziedziną, która dopiero się rodziła" – napisał. „Był to nowy gatunek nauki i naukowców. Wszystko było nowe. Nie było żadnych ograniczeń. Wszyscy byli pełni entuzjazmu. Nowa dyscyplina przyciągnęła miłośników fizyki, chemii, genetyki i biologii. Wierzyliśmy, że nawet najbardziej skomplikowane zjawiska biologiczne można, działając wytrwale, wyjaśnić na poziomie molekularnym, a także że zjawiska dające się dostrzec u najmniejszych form życia, takich jak wirusy lub bakterie, mają swoje odzwierciedlenie w bardziej złożonych organizmach".

Capecchi połknął haczyk. Złożył podanie o przyjęcie na studia na Harvardzie „uznawanym za Mekkę w dziedzinie biologii molekularnej" i został przyjęty przez Jamesa Watsona – odkrywcę wspólnie z Francisem Crickiem struktury DNA w 1953 roku – który, pytany wcześniej o radę, powiedział młodemu Włochowi, że „musiałby być kompletnie szalony, żeby pójść gdziekolwiek indziej". Jak zauważył Capecchi, „bezpośredniość tego stwierdzenie była bardzo przekonująca". Na Harvardzie był w swoim żywiole i rozwinął się pod „bezwzględnym", ale sprawiedliwym i dającym wsparcie nadzorem Watsona. „Praca w laboratorium Jima była fantastycznym przeżyciem" – pisał Capecchi. „Jako człowiek był dla nas niejako uosobieniem biologii molekularnej, a my, jego studenci, byliśmy jej oddanymi adeptami. Jego

brawura wzmacniała pewność siebie u wszystkich wokół... Uczył nas, żeby nie zajmować się błahymi pytaniami, bo wtedy otrzymamy tylko błahe odpowiedzi... Jeśli ktoś przeszedł przez laboratorium Jima, to cała reszta była już jak bułka z masłem. To były naprawdę świetne studia".

Po obronie doktoratu Capecchi spędził na Harvardzie jeszcze 6 lat, a potem wybrał otwarte przestrzenie i surowe krajobrazy stanu Utah, gdzie dołączył do nowo powstającego wydziału biologii molekularnej na uniwersytecie stanowym, tworzonego przez naukowców, których podziwiał i których wizję podzielał. Właśnie tam pracuje do dziś i właśnie tam w 1989 roku stworzył pierwsze znokautowane myszy. To właśnie doświadczenia z tego typu myszami pozwoliły później Scottowi Lowe'owi i Tylerowi Jacksowi zbadać rolę genu p53 w apoptozie.

CO SIĘ STANIE, JEŚLI USUNIEMY p53

„Uniwersytet Wisconsin to szkoła rolnicza i naszym modelem zwierzęcym zawsze była świnia. Zatem oprócz wiedzy na temat tego, w jaki sposób lipoproteiny[31] oddziałują ze swoimi receptorami i dlaczego brak takiego oddziaływania prowadzi do zwiększenia poziomu cholesterolu, miałem również doświadczenie w pracy z modelami zwierzęcymi – zwłaszcza z dużymi". W taki właśnie sposób o swoim zetknięciu z biologią molekularną opowiada mi Scott Lowe. Wysportowany, zdrowo wyglądający mężczyzna uśmiecha się, wspominając tamte czasy. W szkole nie był miłośnikiem nauk ścisłych i wyobrażał sobie, że zostanie prawnikiem. Jednakże podczas studiów licencjackich wśród wybranych przez niego przedmiotów znalazły się biochemia i genetyka. Dzięki temu miał okazję spróbować pracy

w laboratorium i bardzo mu się to spodobało – uznał, że praca, która polega na zadawaniu pytań i testowaniu rozmaitych odpowiedzi to świetna zabawa. Zrozumiał, że prowadzenie badań to właśnie coś, co chciałby robić i po skończeniu studiów na uniwersytecie stanowym udało mu się dostać do MIT, kolebki błyskotliwych umysłów i nowej wiedzy, gdzie 30 lat wcześniej swoje powołanie odkrył również Mario Capecchi.

W MIT Lowe poznał Tylera Jacksa, młodego naukowca, który z entuzjazmem przyjął nowatorską technologię opracowaną przez Capecchiego i jego kolegów, i z wielkim zaangażowaniem tworzył kolejne transgeniczne myszy, by badać rozmaite geny związane z powstawaniem raka. Jacks dysponował niewielką grupą myszy, z których usunął różne geny supresorowe i zadawał sobie proste, ale oczywiste pytanie – czy zwierzęta zachorują na raka? Miał także model myszy z usuniętym p53, ale ponieważ ktoś inny wcześniej znalazł odpowiedź na jego pytanie, nie bardzo wiedział, co teraz z nimi zrobić. Dlatego był szczęśliwy, kiedy Lowe zaproponował mu alternatywne eksperymenty.

Lowe był już wtedy zafascynowany zjawiskiem apoptozy. Podczas kilku wcześniejszych doświadczeń, które przeprowadził na kulturach komórkowych, zauważył – ku swemu zdziwieniu – że proces ten zachodzi w reakcji na działanie onkogenu. Nie był jednak pewien, jaką rolę odgrywa w tym zjawisku p53. Miał nadzieję, że eksperymenty na myszach typu znokautowanego mogłyby to wyjaśnić. Czytał również artykuł Orena w „Nature" na temat wrażliwych na temperaturę mutacji i doświadczeń z komórkami białaczki, które popełniały samobójstwo w obniżonej temperaturze, kiedy zmutowany gen zamieniał się w typ dziki. „Doświadczenia Moshe Orena były bardzo ciekawe, ale doszło w nich do nadekspresji genu p53, a to zawsze może

dawać mylące wyniki – tak naprawdę nie wiadomo, czy gen zachowuje się tak samo w naturalnych warunkach" – wyjaśnia Lowe, gdy odwiedzam go w Memorial Sloan Kettering Hospital. Jego laboratorium mieści się na 11 piętrze i rozpościera się z niego spektakularny widok na morze nowojorskich dachów. Sugeruję, że nadekspresja to jak walenie młotkiem. „Dokładnie. Komórki chorują i umierają, prawda? Dlatego to nie było do końca jasne. Zwłaszcza że wciąż panowało przekonanie, że p53 to gen będący kontrolerem".

Chcąc sprawdzić, czy gen p53 wywołuje apoptozę również w naturalnych warunkach, Lowe postanowił przeprowadzić doświadczenia na grasicy, szczególnie wrażliwym gruczole, w którym zjawisko programowanej śmierci komórki odgrywa istotną rolę. Grasica wytwarza tymocyty, ważne komórki odpornościowe, z których powstają limfocyty T. Limfocyty T mogą wywoływać choroby autoimmunologiczne, kiedy zaczynają atakować komórki własnego organizmu zamiast odpierać ataki najeźdźców. Naukowcy odkryli, że aby zapobiec tego typu sytuacjom, organizm naturalnie pozbywa się potencjalnie groźnych tymocytów właśnie metodą apoptozy, która stanowi element regularnego cyklu produkcji i kontroli jakości w grasicy. Wiedząc o tym, Barbara Osborne, immunolożka przebywająca w MIT na urlopie naukowym, zaproponowała grasicę jako idealny narząd do badań dla Lowe'a i Jacksa.

Jak wyjaśnia Lowe, znamy wiele bodźców, które mogą spowodować samobójstwo tymocytów. „Postanowiliśmy zatem po kolei stosować je i porównywać reakcje normalnych myszy z reakcjami tych pozbawionych p53. Stosowaliśmy różne metody i zazwyczaj komórki obumierały tak samo, bez względu na to, czy myszy miały gen p53, czy też nie. Odmienne reakcje

zaobserwowaliśmy wyłącznie przy napromieniowaniu – o którym wiadomo, że uszkadza DNA. Używaliśmy maszyny wytwarzającej promienie gamma – te same, które stosowane są podczas radioterapii – i naświetlaliśmy nimi myszy. Okazało się, że w tych organizmach, którym usunięto p53, obumarło znacznie mniej tymocytów niż w innych. Był to więc swego rodzaju dowód genetyczny na to, że p53 jest kluczowy dla skuteczności apoptozy – nie z zasady, dla wszystkich typów komórek, ale na pewno dla jednego rodzaju – tych, które zostały poddane napromieniowaniu".

„W pewnym sensie pasowało to do ogólnego wzorca. Wiedzieliśmy, że uszkodzenie DNA aktywuje gen p53, jednak w przypadku innych rodzajów komórek, testowanych wcześniej, dochodziło do zatrzymania podziału w punkcie kontrolnym. Tutaj komórki umierały". Był to ostateczny dowód na związek p53 z zachodzeniem procesu apoptozy w naturalnych warunkach i było to niezwykle istotne odkrycie. Lowe i Jacks – którego znokautowane myszy posłużyły Kastanowi do potwierdzenia hipotezy o ruszającym do akcji, po uszkodzeniu DNA, genie p53 – mierzyli wysoko. „Od razu wiedzieliśmy, że to bardzo ważne odkrycie i że musi zostać opisane w jakimś prestiżowym piśmie" – mówi Lowe.

Niestety, musieli się pogodzić z remisem. Po drugiej stronie Atlantyku Andrew Wyllie wspólnie z Alanem Clarke'em, kolejnym miłośnikiem transgenicznych myszy, przeprowadzili dokładnie taki sam eksperyment z tymocytami, z identycznym rezultatem. W wyścigu o to, kto pierwszy opublikuje wyniki, oba zespoły szły łeb w łeb. Oba złożyły swoje teksty do „Nature". Ku zaskoczeniu Lowe'a, teksty ukazały się jednocześnie, w tym samym numerze z kwietnia 1993 roku. „Towarzyszyło im krótkie

podsumowanie pióra Davida Lane'a, który podkreślał, jak ważne to odkrycie..." – kończy swą opowieść Lowe. Jeszcze po tylu latach w jego głosie da się słyszeć nutę zawodu.

Również dla Wyllie'go odkrycie roli p53 w procesie apoptozy komórki grasicy po jej napromieniowaniu, było jednym z najbardziej elektryzujących momentów w karierze naukowej. „Omal tego nie przeoczyliśmy!" – wspomina podczas naszego spotkania w Sheffield. Wyllie zaczął od bombardowania myszy pozbawionej p53 sterydami. Bodziec ten miał wywołać obumieranie tymocytów. Był to najbardziej naturalny scenariusz. Jednak, co bardzo istotne, sterydy nie powodują uszkodzeń DNA. „Zatem użyliśmy sterydów i nic się nie zdarzyło. Nie było różnicy między myszami z p53 a tymi, u których usunięto gen. Komórki jednych i drugich umierały w jednakowym tempie". Dlatego Wyllie i Clarke postanowili, poniewczasie, napromieniować grasice myszy pozbawionych p53, by sprawdzić, co się dzieje, kiedy DNA zostanie uszkodzone. „Efekty były zupełnie inne" – komentuje Wyllie. „Po napromieniowaniu komórek myszy, u których pozostawiliśmy p53, dało się zaobserwować wyraźne, powtarzalne obumieranie tymocytów, czyli ich apoptozę. Kiedy wykonaliśmy to samo doświadczenie z myszami, u których usunięto p53, komórki nie umierały... To była absolutnie wspaniała chwila! Pamiętam, że artykuł napisaliśmy w ciągu jednego weekendu" – dodaje Wyllie z uśmiechem.

DOŚWIADCZENIA NA MYSZACH RODZĄ TRUDNE PYTANIA

Przewińmy teraz naszą historię o kilkanaście lat do przodu, do pierwszych lat XXI wieku i laboratorium Gerarda Evana –

tego, którego poznaliście na początku książki, gdy zastanawiał się, jak to się dzieje, że nowotwory pojawiają się tak rzadko w niepoliczalnej populacji komórek. Evan to człowiek jedyny w swoim rodzaju. Od czasu do czasu rzuca bombę, która burzy spokój środowiska i podważa dominujące poglądy. Tak właśnie było w 2006 roku. W poszanowaniu wiedzy o roli każdego z elementów komórki w funkcjonowaniu całego organizmu, Evan zawsze był wielkim entuzjastą doświadczeń na transgenicznych myszach. „Komórki w nowotworach przez cały czas wzajemnie na siebie oddziałują. To nie jest tak, że każda robi swoje i na tym ich zadania się kończą" – wyjaśnia. „One przez cały czas się między sobą porozumiewają, ale także reagują na aktywność zdrowych komórek i oddziałują na nie, wydają im polecenia i instrukcje. A wszystko to dlatego, że każdy z nas jest wielokomórkowym organizmem, w którym wszystkie ciałka nieustannie się między sobą komunikują".

Evan wykorzystał technologię rekombinacji ukierunkowanej, by stworzyć bardziej zaawansowaną odmianę myszy pozbawionej genu p53. Zastąpił naturalny p53 wersją zmodyfikowaną w taki sposób, że mógł dowolnie przełączać go między dwoma stanami – aktywnym i nieaktywnym – podając lub usuwając określony lek (hormon), który kontrolował „tłumik" genu.

Gen p53 był już wówczas powszechnie uznanym „strażnikiem genomu", który rusza do działania w reakcji na uszkodzenie DNA. Jednak wyniki eksperymentów Evana nasunęły mu pytanie, czy funkcja i działanie p53 jako supresora nowotworowego są rzeczywiście tak proste i jednoznaczne, jak powszechnie sądzono. Chciał to sprawdzić i w efekcie podważył to przekonanie. Do swojego eksperymentu potrzebował nowotworu

wywoływanego przez uszkodzenie DNA, więc wybrał białaczkę. Z praktyki wiedział, że jeśli p53 nie funkcjonuje, choroba rozwinie się u myszy bardzo szybko w następstwie napromieniowania. Wiedział również, że myszy będą chronione przed nowotworem nawet po napromieniowaniu, o ile w ich komórkach będzie zdrowy i właściwie funkcjonujący p53. To było jasne.

Jednak Evan i jego zespół szukali odpowiedzi na bardzo proste pytanie: czy p53 musi być obecny w komórkach dokładnie w tym momencie, gdy dochodzi do uszkodzenia DNA, by móc ochronić organizm przed nowotworem? Inaczej rzecz ujmując: na jakim etapie rozwoju nowotworu działanie p53 staje się konieczne, by uchronić organizm przed galopującym rozwojem wyniszczającej choroby? Odkrycie odpowiedzi na to pytanie nie było łatwym zadaniem. Wymagało przeanalizowania dwóch scenariuszy – pierwszego, w którym p53 był obecny i aktywny w chwili napromieniowania i drugiego, w którym gen był wyciszony w momencie działania bodźca.

Doświadczenia wykonane w ramach pierwszego scenariusza nie przyniosły na początku żadnych niespodzianek. Badacze zobaczyli to, czego się spodziewali: myszy poczuły się bardzo źle – komórki w narządach limfatycznych, szpiku kostnym i jelitach zaczęły masowo wymierać. „Zawsze uważano, że to jest cena, którą trzeba zapłacić: p53 pozbywa się przecież uszkodzonych komórek, prawda?" – komentuje Evan. „No i tak to właśnie przebiega. Zwierzęta chorują z powodu masowego wymierania komórek, ale potem powracają do zdrowia". Kiedy p53 wykonał swoją pracę w reakcji na uszkodzenie DNA spowodowane napromieniowaniem, naukowcy z powrotem „wyłączyli" gen i tym razem się zdziwili. „Wierz lub nie, ale zachorowalność na raka była taka, jakby tam nigdy nie było p53! Zatem jeśli

chodzi o supresję nowotworu, to cały wysiłek poszedł na marne, okazał się bez znaczenia".

Następnie Evan i jego współpracownicy przeprowadzili odwrotny eksperyment – wyciszyli i dezaktywowali p53 w momencie napromieniowania myszy. Także i tym razem początkowa reakcja nie zaskoczyła – myszy nie zachorowały, ponieważ przy nieaktywnym p53 nie doszło do masowych samobójstw komórek. Jednak to, co zdarzyło się później, zupełnie zbiło badaczy z tropu. Kiedy upłynęło dość czasu, by organizmy myszy naprawiły uszkodzenia DNA, badacze aktywowali gen p53. Myszy nie tylko nie poczuły się źle – nie doszło do masowego obumierania naprawionych komórek – ale, ku ogromnemu zaskoczeniu badaczy, u żadnego ze zwierząt nie pojawił się nowotwór. Innymi słowy, p53 trzymał raka w szachu, mimo tego, że został aktywowany długo po tym, jak doszło do uszkodzenia DNA.

Jakie wnioski naukowcy wyciągnęli z tego niezwykłego obrazu? Według Evana wynik doświadczenia oznacza, że nawet jeśli w chwili uszkodzenia [DNA] w organizmie nie ma p53 lub jest on nieaktywny, większość komórek, które uległy zniszczeniu, zostanie naprawiona. Ponieważ w warunkach naturalnych przypomina to raczej przypadkowy proces łatania, towarzyszyć mu będą „błędy" – będące przejawem siły stojącej za ewolucją. Jeśli jednak po zakończeniu procesu naprawy przywrócone zostanie [działanie] p53, gen aktywuje się tylko w uszkodzonych, zmutowanych lub w jakikolwiek inny sposób niebezpiecznych (na przykład dlatego, że istnieją w nich aktywne onkogeny) komórkach, i będzie wysyłał sygnały wzywające do reakcji. „Świadczy to o tym, że możemy oddzielić funkcję polegającą

na aktywacji mechanizmów naprawy DNA od funkcji supresorowej" – dowodzi Evan.

Odkrycie to może mieć ogromne implikacje dla metod leczenia nowotworów, oznacza bowiem, że możliwe jest opracowanie sposobów pozwalających zapobiegać najbardziej niszczącym skutkom ubocznym chemio- i radioterapii – wypadaniu włosów, mdłościom, wyczerpaniu, obniżeniu odporności. Sa one bezpośrednią konsekwencją uderzania we wszystkie szybko dzielące się komórki w ludzkim ciele. Zamiast tego moglibyśmy atakować tylko te komórki, które potencjalnie mogą stać się komórkami rakowymi, ponieważ wysyłają sygnały alarmowe aktywujące gen p53. W jaki sposób koledzy Evana zareagowali na jego odkrycie i teorię?

„Wiesz, zazwyczaj potrzeba trochę czasu, żeby środowisko przyjęło jakąś koncepcję. Choćby w stopniu umożliwiającym publikację na jej temat... Pamiętam, jak jeden z recenzentów napisał: «Nie mogę zaakceptować pomysłu, że naprawa DNA nie stanowi głównej ścieżki działania genu supresorowego». A przecież to nie jest kwestia wiary, tu nie chodzi o jakąś religię tylko o dane. Nie twierdzę, że wszyscy się mylą. Mówię tylko: «To są dane. To jest nasze wyjaśnienie. To są nasze hipotezy». Cały sens publikacji polega na tym, że pokazujesz ludziom dane i prezentujesz swoją hipotezę, tak aby inni mogli ją zweryfikować".

„Tamte doświadczenia były bardzo intrygujące i moim zdaniem bardzo pouczające. Nikt nie podważył naszych wniosków. Problem tkwi w tym, że nowotwory powstają w różnych tkankach i na różne sposoby. Dlatego najważniejsze moim zdaniem nie jest to, które dane są właściwe, a które nie, tylko to,

byśmy zrozumieli, z jakimi prawidłowościami mamy do czynienia w poszczególnych przypadkach".

RÓWNOWAGA MIĘDZY ŻYCIEM A ŚMIERCIĄ

Pomysły Evana spotkały się z jeszcze silniejszym oporem, gdy kilka lat wcześniej, na podstawie badań onkogenów, zasugerował, że wszystkie nasze komórki mogą zawierać zarówno program podziału, jak i samobójstwa, i że oba te programy nieustannie ze sobą rywalizują. Ostateczne zachowanie komórki kontrolowane jest przez jej otoczenie i sygnały, które odbiera. Czy jest we właściwym miejscu i we właściwym czasie? Czy zachowuje się prawidłowo? Jeśli tak, otrzymuje sygnał, że ma pozostać przy życiu, jeśli nie, ulega autodestrukcji. Zdaniem Evana tak wygląda wbudowany w nas system obronny i właśnie dlatego nowotwory pojawiają się tak rzadko.

Ponieważ ta opowieść cofa nas nieco do badań prowadzonych na szalkach Petriego, może się wydawać odległa od tematu doświadczeń na zwierzętach. Jednak oprócz tego, że opowiada ona o jednym z kluczowych momentów w dziejach badań nad nowotworami, pokazuje też, dlaczego doświadczenia należy przeprowadzać zarówno na wyhodowanych kulturach, jak i na żywych organizmach. Wszystko zaczęło się pod koniec lat 80. ubiegłego wieku, kiedy Evan, świeżo zatrudniony w Imperial Cancer Research Fund (ICRF) w Londynie, przeprowadzał doświadczenia z silnym onkogenem o nazwie Myc, badając, w jaki sposób stymuluje on podział komórek. „Zauważyłem coś bardzo dziwnego. Podczas zwiększonej ekspresji Myc rzeczywiście inicjował podział komórek, ale kiedy spojrzałem do preparatu kilka dni później, okazało się, że jest w nim mniej komórek niż

przedtem" – tłumaczy Evan. „Głęboko wierzę w siłę osobistych obserwacji. Kiedy przyglądasz się różnym procesom, przychodzą ci do głowy pytania o to, co naprawdę widzisz. Dlatego wzięliśmy te komórki, umieściliśmy je pod mikroskopem i podłączyliśmy kamerę poklatkową, ustawiając ją w taki sposób, by robiła zdjęcia co trzy minuty. Później odtwarza się powstały w ten sposób film w przyspieszonym tempie i zdarzenia z kilku dni można obejrzeć w ciągu kilku minut. Dzięki temu mogliśmy zaobserwować zadziwiające zjawisko... Komórki się dzieliły, ale równocześnie umierały w wyniku apoptozy".

Wyglądało to bardzo ciekawie, jednak nie miało sensu. Dopiero później Evan przypomniał sobie swój kurs immunologii i teorię głoszącą, że układ odpornościowy chroni organizm przed nowotworami, ponieważ eliminuje zmutowane komórki, które uznaje za niebezpieczne. „Pomyślałem, że być może układ odpornościowy nie działa wcale jak policja poszukująca komórek mnożących się bez kontroli, tylko po prostu opcja eliminacji jest stałym elementem programu podziału w każdej komórce. Być może za każdym razem, kiedy nowa komórka wyposażana jest w mechanizm proliferacji, wyposażana jest również w mechanizm samobójstwa?". Gdyby tak było, argumentował dalej Evan, musiałby istnieć również jakiś czynnik mówiący komórkom czy mają dalej żyć, czy umrzeć. Doszedł do wniosku, że czynnikiem tym mogłoby być podłoże, na którym hodował kultury komórek do swoich eksperymentów. Zazwyczaj wykorzystywał w tym celu surowicę – bezbarwny płyn wytwarzany przez organizm w miejscu uszkodzenia skóry, widoczny w postaci niewielkich kropli – ponieważ zawiera ona substancje wspomagające krzepnięcie krwi, a także przetrwanie, podział i rozwój komórek niezbędnych dla naprawy i regeneracji uszkodzonej tkanki. Myc

zabijał komórki, kiedy Evan wyjmował kulturę z pełnej odżywczych składników surowicy i umieszczał ją na innym podłożu, które przypominało bardziej warunki panujące wewnątrz ciała.

„Wydaje mi się, że doświadczenia z genem Myc pokazały nam po raz pierwszy znany dziś dobrze mechanizm kontroli wzrostu funkcjonujący w naszych komórkach. Działa on w taki sposób, że wszystkie czynniki, których celem jest podział i rozwój komórek (czyli, które niosą z sobą ryzyko wywołania nowotworu, jeśli ulegną mutacji i pozostaną na stałe w pozycji «włączonej»), mają również wbudowany element, który hamuje podział i wzrost tych komórek".

Podobne doświadczenia na innych onkogenach pokazały, że one również, na różne sposoby, wygaszają program wzrostu po krótkim okresie podziału. Na przykład Ras robi to, zatrzymując na stałe komórkę, ale jej nie zabijając – utrzymuje ją w stanie tzw. „senescencji replikacyjnej", w którym ta traci zdolność podziału, ale pozostaje żywa i aktywna. Obserwacje te wywołały jednak kolejne pytania. Onkogeny, takie jak Myc i Ras, jeśli nie są zmutowane, powinny przyczyniać się do wzrostu komórek, jeśli zatem ich zadaniem miałoby być również powstrzymywanie tego wzrostu lub eliminacja komórek, to jak w ogóle tworzą się nowe tkanki? „Odpowiedź brzmi: jeśli komórka, która w reakcji na sygnał nakazujący wzrost aktywuje Myc i rozpoczyna replikację, znajduje się we właściwym miejscu w organizmie i pozostaje w tym miejscu, a nie rozlewa się wokół jak nowotwór, to zostaje uznana za zdrową i nie zostaje wyeliminowana, jasne?".

„Zatem replikacja to swego rodzaju społeczny obowiązek komórek. Komórki nie są autonomiczne. Wyciągając je

z naturalnego środowiska, wkładając do butelek i dodając wszystkie czynniki, które zapobiegają ich umieraniu, całkowicie ignorujemy to podstawowe prawo biologii. Zawsze je ignorowaliśmy! Obecnie przekonanie o tym, że czynniki wywołujące wzrost komórek mogą również ten wzrost zatrzymywać lub wręcz powodować śmierć komórek, stanowi utrwaloną wiedzę z zakresu biologii molekularnej. Po prostu przyjmuje się, że tak właśnie jest. Ale w tamtych czasach ludzie dosłownie wychodzili w trakcie moich wykładów!".

Prawdę mówiąc, Scott Lowe, pracujący wówczas nad doktoratem w MIT, oraz jego promotor Earl Ruley zaobserwowali dokładnie to samo niezwykłe zjawisko – onkogeny zabijające komórki lub skazujące je na senescencję replikacyjną. Oni również mieli problem z tym, by przekonać do tego innych. „Gdybyśmy przeszli jednym z korytarzy na MIT krzycząc: «Znaleźliśmy onkogen, który zabija komórki», wszyscy pomyśleliby, że zwariowaliśmy. Przecież to nie jest coś, co robią onkogeny. One sprawiają, że komórki szybciej się dzielą" – śmieje się Lowe.

Dane, które on i Evan zgromadzili podczas swoich badań, pozwoliły również wyjaśnić inną odwieczną tajemnicę – dlaczego onkogeny mogą wywoływać nowotwory wyłącznie we współpracy z innymi onkogenami. Evan uważa, że jeśli na przykład Myc i Ras są aktywowane jednocześnie, to Myc jest w stanie zneutralizować mechanizm senescencji kontrolowany przez Ras, a Ras radzi sobie z programem apoptozy kontrolowanym przez Myc. Jeśli onkogeny funkcjonują w pojedynkę, gwałtowny z początku wzrost załamuje się, jednak gdy działają wspólnie, zaczyna się piekło. Za jakiś czas zarówno Evan, jak i Lowe niezależnie odkryją, że sytuacje, które obaj

obserwowali i analizowali – obumieranie kontrolowanych przez onkogeny komórek – są wynikiem aktywowania przez onkogeny supresorów nowotworowych, często także genu p53.

Liczne eksperymenty na myszach – całkowite usuwanie genu p53 lub manipulowanie nim w taki sposób, by mógł być na przemian aktywny i nieaktywny – pokazały jasno, że p53 to naprawdę potężne białko. Jednak jako arbiter decydujący o przeżyciu lub śmierci komórek, gen p53 musi znajdować się pod ścisłą kontrolą. Na czym ona polega?

ROZDZIAŁ 13

Czynniki hamujące podział komórki

...w którym dowiadujemy się, że:
a) niezwykle silny gen p53, który może zatrzymywać lub zabijać komórki jest trzymany na bardzo krótkiej smyczy przez białko Mdm2, które wiąże się z białkiem p53 w komórkach i ściśle reguluje jego poziom,
b) Mdm2 uwalania p53 ze swojego uścisku tylko wówczas, kiedy dotrze do niego sygnał o zagrożeniu i potrzebna jest reakcja supresora nowotworowego.

* * *

Badania nad nowotworami są niezwykłe i fascynujące także dlatego, że aby zrozumieć, jakie nieprawidłowości prowadzą do powstania raka, musimy najpierw wiedzieć, jak na co dzień wygląda prawidłowy przebieg wszystkich procesów w organizmie.
Gerard Evan

„Strażnik genomu", metafora, którą Gerard Evan określił gen p53 w 1992 roku, skutecznie przemawia do wyobraźni. Pozwoliła ona temu niezwykłemu genowi o pospolitej nazwie zaistnieć w mediach i w świadomości opinii publicznej. Jednak w ciągu ponad 20 lat, które minęły od czasu, gdy zaczęto używać tego

określenia, lista bodźców, na które reaguje p53, znacząco się wydłużyła i dziś sięga daleko poza sygnały o uszkodzeniu DNA. Arnie Levine sugeruje, że bardziej właściwym terminem mógłby być „czynnik integralności", ponieważ p53 zapewnia, że w czasie podziału komórki powstają wierne kopie DNA. Wiemy też, że gen reaguje na wstrząs termiczny (sytuację, w której komórka wystawiona jest na działania temperatury wyższej lub niższej od idealnej temperatury ciała), brak tlenu lub glukozy, obecność pewnych trucizn, naturalne procesy starzenia oraz działalność onkogenów, czyli na wszystkie czynniki, które mogą zagrozić wiernemu odtworzeniu DNA podczas replikacji.

„Od czasu swojej ewolucji u bezkręgowców, p53 zawsze był czynnikiem integralności" – przekonuje Levine. Jeśli robakowi zabraknie glukozy, nie będzie wytwarzał jaj. Jeśli napromieniujemy muszkę owocową, przestanie wytwarzać nasienie lub jaja do czasu odbudowania komórek rozrodczych o zdrowym genomie. W przypadku ewolucji kręgowców – bardziej złożonych organizmów, w tym także ludzi – zasada ochrony integralności genów w komórkach rozrodczych, czyli w nasieniu i jajach, z których powstaje potomstwo, została po raz pierwszy rozszerzona na wszystkie komórki ciała. „I tu właśnie pojawia się p53" – mówi Levine. „Reaguje na stres i zabija. Wymusza wierność DNA, zabijając komórki, które jej zagrażają! Ma zatem bardzo ciekawą historię ewolucyjną".

Bardzo niedawno naukowcy odkryli jeszcze jeden fascynujący aspekt działania p53 w roli czynnika zapewniającego integralność DNA. Wyobraźcie sobie przez chwilę, co by się zdarzyło, gdyby w normalnych warunkach nasze biologiczne zegary mogły się cofać, gdyby nasze dojrzałe komórki mogły powrócić do swojego początkowego stanu niezróżnicowanych komórek macierzystych

z pełnymi możliwościami i rozwijać się od nowa, tworząc inne tkanki. W tym koszmarnym scenariuszu komórki wątroby mogłyby się spontanicznie przekształcić w komórki kości, komórki jelit w zęby, a krew w nerkę, powodując całkowitą destabilizację ciała. Na szczęście p53 pilnuje, by takie sytuacje nie miały miejsca, by nasz biologicznych czas nieubłaganie posuwał się do przodu, a procesy zachodzące w ciele zmierzały zawsze w jednym kierunku (rzecz jasna, o ile nie zakłóci ich niekontrolowany atak nowotworu). Naukowcy tworzący tak zwane „indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste" (komórki IPS) – powstałe w warunkach laboratoryjnych dzięki „przeprogramowaniu" zróżnicowanych dorosłych komórek w komórki macierzyste, które mogą zostać na nowo znamieniowe w dowolne wyspecjalizowane komórki – naruszają jedno z podstawowych praw natury i w tym celu muszą również pokonać mechanizmy obronne p53.

Wielu badaczy starało się odkryć czynniki kontrolujące zachowania genu p53. Jednym z nich był Moshe Oren, który wykorzystał w tym celu zmutowane, wrażliwe na temperaturę geny. Było to na początku lat 90. ubiegłego wieku, jeszcze zanim zaczęto powszechnie wykorzystywać w badaniach transgeniczne myszy. Oren i jego zespół używali wrażliwego na temperaturę mutanta p53 w kulturach komórek jako narzędzia, które miało im ułatwić odpowiedź na pytanie, czym różnią się komórki z aktywnym p53 od tych, w których gen jest nieaktywny. Szybko zauważyli pewne białko związane z białkiem p53, pojawiające się zawsze, kiedy w temperaturze 33°C p53 zachowywał się jak typ dziki, czyli supresor nowotworowy, zarazem nieobecne, gdy p53 zachowywał się jak mutant.

To samo zjawisko zaobserwował Levine podczas swoich doświadczeń prowadzonych w celu odkrycia metod działania typu dzikiego genu p53. Zidentyfikował owo białko jako Mdm2, znane wcześniej badaczom jako potencjalny onkogen. Levine zauważył również, że wiążąc się z p53, białko Mdm2 powstrzymywało działanie genu supresorowego, zachowując się bardziej jak policjant pilnujący podejrzanego niż jak pasażer na gapę. Z kolei członkowie zespołu Orena, zmieniając temperaturę wokół szalek Petriego, odkryli, że Mdm2 pojawia się tylko w komórkach z normalnym p53, a nie występuje nigdy, jeśli gen jest zmutowany. Zaczęli się więc zastanawiać, co to oznacza.

Oren i jego współpracownicy zdali sobie sprawę, że mają w ręku kluczowy element układanki, która pozwoli im odkryć mechanizm kontroli genu p53. Czas na to był odpowiedni. „Był rok 1993. Jeszcze dwanaście miesięcy wcześniej nie wiedzielibyśmy, co z tym zrobić. Moglibyśmy jedynie skonstatować, że to bardzo ciekawe" – wspomina Oren. Ale właśnie rok wcześniej Carol Prives i Bert Vogelstein dowiedli, że białko p53 jest „czynnikiem transkrypcyjnym", którego zadaniem jest włączanie i wyłączanie innych genów. Vogelstein zidentyfikował jedno z białek aktywowanych przez p53 i wydawało się, że Mdm2 może być kolejnym – że aktywuje je typ dziki p53. Dalsze eksperymenty potwierdziły tę hipotezę. Dodatkowo, jak mówi Oren, „wiedząc, że Mdm2 w pewnym sensie hamuje działania p53, co Arnie odkrył już wcześniej, i zaobserwowawszy, że p53 uaktywnia Mdm2, odkryliśmy «sprzężenie zwrotne», które szczęśliwie okazało się nie tylko interesujące, ale również niezwykle istotne, jako że jest ono głównym elementem regulacji działań p53 w komórce. Pętla

sprzężenia zwrotnego z Mdm2 stanowi prawdopodobnie centralny punkt sieci regulującej funkcjonowanie p53".

Tak naprawdę badacze nie rozumieli wówczas do końca owej pętli sprzężenia zwrotnego, w której jedno białko aktywuje inne, które później hamuje jego działania. Ciągle brakowało dwóch ważnych elementów układanki, ale laboratorium Orena było bliskie ich odkrycia. Pracujący w nim naukowcy spróbowali wykorzystać zdolność Mdm2 do hamowania działań p53 jako narzędzie w badaniach, podobnie jak wcześniej wykorzystali wrażliwość zmutowanego genu na temperaturę. Tym razem postanowili, że będą dodawać i usuwać kontrolujące [p53] białko do komórek, w których obecny jest gen p53, by w ten sposób przełączać go ze stanu aktywnego w nieaktywny, i z powrotem. „Przeprowadzaliśmy te doświadczenia rutynowo, by dowiedzieć się, jak działa p53, czyli przed czym dokładnie powstrzymuje go Mdm2" – objaśnia Oren. Badacze dość szybko spostrzegli coś, co ich zaintrygowało. Kiedy w komórce były oba białka, nie wyglądało to wcale tak, że Mdm2 wiązało się z p53, hamując jego działanie. Zdawało się, że p53 całkowicie znika. Ponieważ początkowo naukowcy nie byli pewni swoich obserwacji, powtórzyli doświadczenie bardzo uważnie, wprowadzając niewielkie modyfikacje. Uzyskawszy te same wyniki kilka razy z rzędu, upewnili się, że są prawidłowe – Mdm2 niszczyło p53. Później odkryli również, że [Mdm2] zostawiało p53 swego rodzaju „pocałunek śmierci" w postaci niewielkiego chemicznego znacznika, informującego komórkowy mechanizm rozkładu, proteazom, że białko przeznaczone jest do degradacji.

Tak więc, według nakreślonego przez zespół Orena obrazu, p53 aktywuje Mdm2, którego działanie prowadzi do degradacji p53, a wszystko to przebiega w powtarzającym się cyklu, trwającym

od 5 do 20 minut. W rezultacie przez większość czasu ilość p53 w komórkach jest tak niska, że jest ono niemal niemożliwe do wykrycia. (W ten sposób udało się przypadkowo wyjaśnić, dlaczego podczas doświadczeń poziom białka w komórce jest znacznie wyższy w przypadku mutacji – ponieważ mutacja powoduje zerwanie więzów łączących p53 i Mdm2.). W jaki sposób zatem gen supresorowy uwalnia się spod kontroli, by chronić nas przed nowotworem, jeśli zajdzie taka potrzeba? Odpowiedź na to pytanie była ostatnim brakującym elementem układanki. Znalazła ją „fantastycznie utalentowana" młoda adiunkt z Tajwanu, Sheau-Yann Shieh, która w laboratorium Carol Prives na Uniwersytecie Columbia badała proces nazywany fosforylacją.

Fosforylacja to jeden z najważniejszych mechanizmów aktywowania i wyciszania białek w komórkach. Proces polega na przyłączaniu reszty fosforanowej do niektórych aminokwasów, z których składa się białko. Shieh analizowała białko p53 i próbowała odpowiedzieć na pytanie, czy ulega ono fosforylacji. A jeśli tak, to jak wpływa to na jego funkcjonowanie? Odkryła, że p53 ulega fosforylacji i zmienia kształt. Co ciekawe, przy okazji – bo Shieh nie interesowała się historią Mdm2, która ciągle się rozwijała – wykazała, że ten proces osłabia połączenie między p53 i jego regulatorem.

„Wciąż jednak brakowało nam kilku odpowiedzi" – wspomina Prives. Ostatnie palące pytania brzmiały: Jaki czynnik sprawia, że p53 ulega fosforylacji? Czy zdarza się to w warunkach naturalnych? (Do tamtej pory naukowcy obserwowali to zjawisko jedynie w wyhodowanych kulturach laboratoryjnych). I czy jest to związane z uszkodzeniem DNA lub innymi czynnikami wywołującymi stres w komórce? Przy pomocy specjalnych

narzędzi pozwalających wyizolować fosforylowane białka, badacze znaleźli odpowiedzi na wszystkie trzy pytania. Przede wszystkim odkryli, że p53 ulega fosforylacji w warunkach naturalnych. Rzeczywiście, jest to związane z uszkodzeniem DNA i reakcją na stres. I to właśnie jest mechanizm, przez który gen ATM – sprawiający, że pacjenci cierpiący na zespół ataksja-teleangiektazja są tak wrażliwi na promieniowanie – sygnalizuje zagrożenie i wywołuje reakcję p53.

Ten ostatni element uzupełnił układankę składającą się na obraz pętli sprzężenia zwrotnego między p53 i Mdm2, a także pozwolił zrozumieć, na czym ono polega. W skrócie, wygląda to następująco: w normalnej sytuacji białko p53 powstaje w komórkach przez cały czas, tak aby mogło natychmiast zareagować na sygnał o niebezpieczeństwie. Jest zarazem usuwane przez inne białko, Mdm2, niemal od razu po tym, jak zostanie wyprodukowane, gdyż w innym przypadku mogłoby wywołać niepotrzebną śmierć komórek. Jednak gdy zagrożenie lub stres aktywują takie geny jak ATM, p53 ulega fosforylacji, co uwalnia je spod kontroli Mdm2 i umożliwia podniesienie się jego poziomu w komórce oraz właściwą reakcję na zagrożenie – tymczasowe powstrzymanie podziału komórki do czasu zakończenia naprawy DNA, stałe zatrzymanie wzrostu, czyli senescencję lub wywołanie samobójstwa komórki.

Inna badaczka, Gigi Lozano, prowadząca doświadczenia na myszach w MD Anderson Cancer Center w Houston, potwierdziła, że każde z białek jest niezwykle istotne dla prawidłowego funkcjonowania tego drugiego, także w warunkach naturalnych. Kiedy stworzyła transgeniczne myszy pozbawione białka Mdm2, skazała je na śmierć. Uwolnione spod wszelkich barier p53 wywołało masową apoptozę wszystkich

komórek. Z kolei, kiedy Lozano opracowała myszy pozbawione zarówno p53, jak i Mdm2, okazało się, że mogą żyć, dopóki nie zachorują na raka.

Do dziś nie wiadomo dokładnie, jak wygląda deaktywacja mechanizmu reakcji na stres, kiedy przestaje on już być potrzebny i w jaki sposób odbywa się przywrócenie kontroli nad p53. Możliwe jednak, że gdy nikną sygnały o zagrożeniu, nie dochodzi do fosforylacji p53 i nic nie chroni już nowo powstających białek przed degradacją. P53 i Mdm2 zaczynają od nowa swój taniec śmierci. Pytanie to pozostaje jednak otwarte, a odpowiedź na nie może być niezwykle istotna, ponieważ dokładne zrozumienie pętli sprzężenia zwrotnego może otworzyć przed nami nowe możliwości wpływania na mechanizm kontrolny p53, a tym samym opracowania nowych metod leczenia nowotworów. To bardzo ciekawy temat, do którego powrócę w jednym z kolejnych rozdziałów.

ROZDZIAŁ 14

Dymiąca strzelba

...w którym odkrywamy, że benzopiren – składnik dymu tytoniowego wywołujący raka – przyczepia się do DNA i uszkadza gen p53. Powoduje przy tym mutację, która jest unikalna i obciążająca jak odciski palców.

* * *

Kiedy czynnik ryzyka wystąpienia jakiejś choroby jest powszechny w jakiejś populacji, paradoksalnie zaczyna być niezauważalny i staje się elementem otoczenia... Gdy niemal wszyscy mężczyźni palili, a tylko nieliczni chorowali na raka, skąd można było się domyślić, że między tymi zjawiskami istnieje jakiś związek?

Siddhartha Mukherjee[32]

W połowie ostatniej dekady ubiegłego wieku gen p53 na krótko zagościł w świadomości opinii publicznej, kiedy odegrał decydującą rolę w walce pomiędzy instytucjami związanymi z ochroną zdrowia a branżą tytoniową, ostatecznie potwierdzając związek między paleniem tytoniu a nowotworami płuc. O tym, że taki związek istnieje, wiedziano już od dawna. Niemal pół wieku wcześniej, w 1950 roku, pracujący w Oksfordzie epidemiolog Richard Doll – postać nietuzinkowa i nieco

kontrowersyjna w środowisku ze względu na przynależność do Partii Komunistycznej – w tekście opublikowanym w opiniotwórczym magazynie „British Medical Journal" zwrócił uwagę na związek między paleniem papierosów a zachorowalnością na raka płuc. W artykule tym Doll wraz ze współpracownikiem Austinem Bradfordem Hillem ogłosił wyniki wspólnego projektu badawczego, którego celem było wyjaśnienie przyczyn nagłego wzrostu zachorowalności na nowotwory płuc w Wielkiej Brytanii.

W okresie dwudziestu pięciu lat między rokiem 1922 a 1947 liczba zgonów spowodowanych nowotworem płuc w Anglii i Walii wzrosła z 612 do 9287 rocznie – była to „jedna z najbardziej uderzających zmian współczynników śmiertelności odnotowanych w krajowych rejestrach" jak stwierdził Doll w swoim raporcie. Tytoń był jedną z niewielu przyjemności, jakich zaznać dane było żołnierzom w okopach I wojny światowej, a papierosy rozdawane były piechurom i marynarzom zarówno w brytyjskiej, jak i w amerykańskiej armii, w ramach przydziału. Podobno generał John Pershing, głównodowodzący Amerykańskich Sił Ekspedycyjnych podczas I wojny światowej, miał kiedyś powiedzieć: „Pytacie mnie, czego potrzebujemy, żeby wygrać wojnę. Odpowiadam, że tytoniu tak samo, jak kul... Musimy dostać tysiące ton bez żadnych opóźnień".

W ten sposób całe pokolenie młodych mężczyzn powróciło do cywila uzależnione od tytoniu, wciągnięte w przyzwyczajenie, którego popularność rosła nieprzerwanie od 1880 roku, kiedy to wynaleziono maszynę do skręcania papierosów, umożliwiającą rozpoczęcie masowej produkcji. Pod koniec lat 40. XX wieku, kiedy Doll i Hill prowadzili swoje badania, około 80 proc. mężczyzn w Wielkiej Brytanii regularnie paliło papierosy,

a umieralność na raka płuc w Anglii i Walii w okresie poprzednich dwudziestu lat wzrosła ponad sześciokrotnie wśród mężczyzn i około trzykrotnie wśród kobiet poniżej 20 roku życia.

Obaj naukowcy nie podejrzewali jednak, że to tytoń jest główną przyczyną przedwczesnych zgonów. Początkowo uważali, że winne jest rosnące zanieczyszczenie powietrza – pył pochodzący z nowych materiałów wykorzystywanych do budowy dróg, asfalt, spaliny samochodowe, elektrownie oraz piecyki węglowe stojące niemal w każdym domu. Jednak obraz nałogu tytoniowego, jaki wyłaniał się z ankiet przeprowadzonych wśród 1732 pacjentów chorych na raka i 734 wizyt w 20 londyńskich szpitalach, wyraźnie wskazywał, że to palenie jest główną przyczyną choroby. Artykuł Dolla i Hilla kończył się konkluzją, że „u osób powyżej 45 roku życia ryzyko wystąpienia (nowotworu płuc) zwiększa się wprost proporcjonalnie do liczby wypalanych papierosów i u tych, którzy palą 25 lub więcej papierosów dziennie i może być nawet 50 razy większe niż u osób niepalących".

Chociaż Doll nie miał pojęcia, jaka substancja zawarta w tytoniu może być rakotwórcza, sam rzucił palenie, widząc skalę problemu. Wraz z rosnącą liczbą dowodów na szkodliwość tego nawyku, władze wielu krajów wprowadziły rozmaite rozwiązania, których celem było jego ograniczenie. Jednak dopóki przekonanie o związku między paleniem tytoniu a nowotworem płuc oparte było na poszlakach i dopóki nie było jednoznacznych dowodów, które potwierdzałyby jego istnienie, koncerny tytoniowe stosowały pokrętne tłumaczenia, broniąc stanowiska i pozycji rynkowej. Nadal agresywnie promowały swoje produkty, szczególnie w krajach rozwijających się, w których potencjał wzrostu był ogromny, a kontrola ograniczona. Nawet

gdy naukowcy kontynuujący prace Dolla i Hilla wykazali, że jeśli skórę myszy laboratoryjnych posmarować smołą – lepkim czarnym osadem tytoniu pokrywającym płuca palaczy – to powstanie nowotwór, wielkie firmy tytoniowe próbowały wyśmiać doświadczenie, twierdząc, że nie ma ono żadnego znaczenia, bo przecież myszy to nie ludzie.

Tak naprawdę pierwszym człowiekiem, który przeprowadzał takie eksperymenty, był argentyński onkolog Angel Honorio Roffo. Wykrył on związek między paleniem tytoniu a nowotworami niemal dwadzieścia lat przed ukazaniem się raportu Dolla i Hilla. Smarując uszy królików i skórę myszy nikotyną oraz smołą, Roffo zauważył, że ta druga substancja jest rakotwórcza. Sama nikotyna nie powodowała żadnych zmian na skórze zwierząt, bez względu na to, jak długo miała z nią kontakt. Jednak wyniki jego szczegółowych badań nad chorobą, na którą cierpieli jego pacjenci, przeszły niezauważone niemal przez nikogo z wyjątkiem firm tytoniowych. Częściowo stało się tak, ponieważ jego najważniejsze prace naukowe zostały opublikowane po niemiecku, a częściowo dlatego, że znacznie wyprzedzał swój czas, jeśli chodzi o znajomość biologii nowotworów. Tak bardzo, że kiedy pewien nowojorski lekarz, który usłyszał o odkryciach Roffo, napisał w maju 1939 roku do biura American Tobacco Company (AT) z pytaniem, czy mają one jakąś wartość, uzyskał uspokajającą odpowiedź od samego dyrektora do spraw badań. Hiram Hanmer, bo tak się nazywał ów dyrektor, odpisał, że AT od pewnego czasu śledzi prace Roffo i uważa, że jego hipotezy na temat oddziaływania tytoniu tworzą „bardzo zaciemniony obraz". Dalej Hanmer zapewnił swojego korespondenta, że „używanie tytoniu nie jest w najmniejszym stopniu związane z występowaniem nowotworów".

Dyskredytowanie opinii naukowych zawsze stanowiło *modus operandi* producentów tytoniu, stało się jednak znacznie trudniejsze – a w końcu niemożliwe – gdy sprawą zajęli się biolodzy molekularni. Curt Harris to człowiek o posturze niedźwiedzia, z gęstą siwą brodą, mówiący głębokim basem, mocnym jak kufel *brown ale*[33]. Curt kieruje Laboratory for Human Carcinogenesis w Narodowym Instytucie ds. Raka w Bethesdzie. Jest również pionierem w stosunkowo młodej dziedzinie epidemiologii molekularnej. To właśnie ta nauka umożliwiła prześledzenie wstecz historii pandemii AIDS aż do początków choroby, sięgających szympansów i makaków zielonych żyjących w afrykańskich lasach, dzięki badaniu śladów genetycznych pozostawianych przez wirusa, który ostatecznie rozwinął się w HIV. To również ta dyscyplina odkrywa i ocenia zjadliwość regularnych epidemii grypy. I to jest ta gałąź nauki, która wykorzystywana jest dziś powszechnie do definiowania zróżnicowanych rodzajów nowotworów.

W latach 80. laboratorium Harrisa zajmowało się badaniem aktywności rozmaitych substancji rakotwórczych, w tym również smoły tytoniowej w komórkach. Naukowcy zauważyli, że wiele z tych substancji wiąże się z DNA. Harris wiedział z lektury i z własnych obserwacji, że taka sytuacja prowadzi do mutacji genowych, co jest pierwszym krokiem na drodze do powstania nowotworu. Zainteresował się bardzo doświadczeniami Berta Vogelsteina i obaj panowie rozpoczęli wspólny projekt badawczy, którego celem było sprawdzenie, jak często dochodzi do mutacji p53 w nowotworach. Było to w roku 1989, tuż po sensacyjnym odkryciu Suzy Baker, że p53 jest supresorem nowotworowym, a nie onkogenem. Harris i Vogelstein znaleźli mutacje p53 w wielu z najczęściej występujących rodzajach nowotworów,

w tym w nowotworach piersi, mózgu, płuc i jelita grubego. Odkryli również, że mutacje tworzą pewne wzory i grupują się w czterech określonych miejscach wzdłuż genu, które nazwali „punktami zapalnymi".

Naukowcy ogłosili te spostrzeżenia w artykule zamieszczonym w „Nature". Niedługo później Harris, zaintrygowany wzorami, które odkrył razem z Vogelsteinem, zaczął gromadzić opisy rozmaitych mutacji zawarte w pojawiających się nieprzerwanie publikacjach dotyczących p53. W 1990 roku wspólnie z Moniką Hollstein z Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (IARC) z siedzibą w Lyonie, instytucji należącej do Światowej Organizacji Zdrowia, nadał swemu zbiorowi ramy formalne, tworząc bazę danych na temat p53. Stanowi ona unikalne źródło wiedzy dla naukowców i lekarzy. Mogą oni znaleźć w niej wskazówki dotyczące różnych karcynogenów występujących w środowisku, a także możliwego przebiegu choroby ich pacjentów oraz najlepszych metod leczenia poszczególnych rodzajów nowotworów.

W 1994 roku Hollstein opuściła IARC, a jej miejsce zajął Pierre Hainaut, który rozszerzył bazę i uzupełnił dodatkowymi szczegółami dla każdego typu mutacji. Hainaut zarządzał bazą do połowy 2012 roku. Obecnie znajdują się w niej dane na temat dziesiątek tysięcy mutacji, a także nowotworów, w których one występują. Można tam znaleźć również informacje dotyczące stylów życia oraz charakterystyk rozmaitych pacjentów, w tym również opisy ich reakcji na terapię i ostatecznych wyników leczenia.

„Stworzyliśmy tę bazę danych, ponieważ byliśmy przekonani, że istnieje związek między środowiskowymi przyczynami nowotworów a różnymi rodzajami mutacji p53", wyjaśnia Harris.

I rzeczywiście, dla epidemiologów molekularnych – detektywów badających tajemnice choroby – baza okazała się bezcenna. Jednym z najlepszych na to dowodów jest jej rola w wyjaśnieniu związku między tytoniem a rakiem.

ODCISKI PALCÓW TYTONIU ZNALEZIONE NA p53

Na początku lat 90. Gerd Pfeifer, który kieruje laboratorium w centrum medycznym City of Hope w mieście Duarte w Kalifornii, badał różnego rodzaju uszkodzenia DNA i ich związek z powstawaniem nowotworów. Pfeifer chciał sprawdzić, czy czynniki powodujące uszkodzenia pozostawiają jakieś ślady na DNA, swego rodzaju „odciski palców", które pozwoliłyby je zidentyfikować. Jego zespół opracował narzędzie pozwalające wyizolować pojedyncze geny spośród tysięcy tworzących nić DNA – czyli jakby znaleźć igłę w stogu siana – i Pfeifer wraz z Michaiłem Denissenką postanowili wykorzystać to narzędzie, by przeprowadzić badania nad p53, który w tamtym czasie stał się obiektem powszechnego zainteresowania naukowców. Chcieli przeanalizować wpływ dymu tytoniowego na p53.

„Wcześniejsze doświadczenia pokazały wyraźnie, jak bardzo aktywnym czynnikiem rakotwórczym jest smoła – czarny osad, który gromadzi się na filtrach papierosów i który można zobaczyć na płucach nałogowych palaczy podczas operacji. Wygląda obrzydliwie" – mówi Pfeifer podczas naszej rozmowy telefonicznej. Obaj z Denissenką wiedzieli, że najbardziej szkodliwe składniki smoły to wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (w skrócie z angielskiego PAH), z których szczególnie

groźny jest benzopiren. Uznali, że będzie on idealnym przedmiotem dla ich doświadczeń.

Inni naukowcy już wcześniej badali, co się dzieje, kiedy PAH dostają się do komórek. Doświadczenia pokazały, że substancje te nie rozpuszczają się w wodzie, więc organizm ma poważne kłopoty z ich usunięciem. Podczas przemiany tych związków w takie, które będzie można wydalić, mechanizm komórki tworzy niebezpiecznie reagujące substancje, które łączą się z DNA. W przypadku benzopirenu ta substancja zawiera w sobie otępiającą formułę oznaczoną skrótem BPDE, która uważana jest za jeden z najgroźniejszych karcynogenów jakie dotychczas odkryto.

Pfeifer i Denissenko dodawali BPDE do rozmaitych typów komórek, w tym do komórek pobranych z ludzkich płuc, i pozostawiali je własnemu losowi. Po godzinie lub dwóch wracali do stołów, by wydzielić DNA i precyzyjnie zidentyfikować miejsca uszkodzenia p53. Jak się okazało, nie były one przypadkowe. BPDE zawsze przyczepiał się do DNA tuż obok guaniny – jednego z czterech klocków budujących DNA, oznaczonego w kodzie DNA literą G – w trzech ściśle określonych „punktach zapalnych", na kodonach nr 157, 248 i 273 (dla przypomnienia powtórzę, że kodon to segment genu o długości trzech zasad, który zawiera kod do stworzenia jednego elementu białka, a numer kodonu informuje, w którym miejscu powinien się znaleźć ten element).

Oto wreszcie był dowód, że określony składnik dymu tytoniowego uszkadza DNA. Jednak by zdobyć argument rozstrzygający w sporze z branżą tytoniową, Pfeifer i Denissenko musieli porównać wyniki swoich badań z informacjami zawartymi w bazie danych mutacji genu p53, która w 1996 roku

zawierała ponad 500 opracowanych na podstawie publikacji z całego świata wpisów dotyczących nowotworów płuc. Przeważająca większość opisanych w bazie mutacji występujących u palaczy, a bardzo rzadko wśród niepalących, była zgodna z wynikami ich doświadczeń. Pojawiały się one w tych samych punktach zapalnych atakowanych przez BPDE i powodowały przemieszczenie klocków budujących gen w taki sposób, że guanina (G) była zastępowana przez tyminę (T). Co najważniejsze, o ile mutacje na kodonach 248 i 273 występują w różnych rodzajach raka, to mutacja na kodonie 157 jest charakterystyczna wyłącznie dla nowotworów płuc. Innymi słowy, odciski palców BPDE były dostępne do porównania w bazie danych mutacji p53. Dlatego w swoim artykule opublikowanym w październiku 1996 roku w „Science" Pfeifer i Denissenko twierdzili: „Nasze badania udowadniają bezpośredni związek pomiędzy określonym karcynogenem znajdującym się w dymie papierosowym a mutacjami genów wywołującymi nowotwory u ludzi".

BRANŻA TYTONIOWA KWESTIONUJE DANE NAUKOWE

Dla koncernów tytoniowych były to złe wiadomości. Oznaczały już nie tylko to, że palenie może zostać uznane za zagrożenie dla zdrowia publicznego, ale również to, że można je połączyć z pojedynczymi przypadkami zachorowań na raka. Producenci tytoniu byli teraz znacznie bardziej narażeni na pozwy sądowe ze strony klientów oczekujących rekompensaty za zrujnowane życie, więc, jak zawsze, przystąpiły do obalania dowodów. Prezes British American Tobacco Industries (BAT) Martin Broughton

w swoim oświadczeniu dla inwestorów, analityków i dziennikarzy wygłoszonym tuż po ukazaniu się artykułu w „Science", stwierdzał: „Ciągle jeszcze brakuje nam pełnej wiedzy na temat przypisywanych paleniu mechanizmów powstawania choroby (...) Znaczenie analizy zamieszczonej w Science polega choćby na przyznaniu, że wciąż jeszcze nie rozumiemy wszystkich przyczyn choroby (...) Może to prowadzić do dalszych badań (...) nad złożonym procesem rakowacenia komórek, który próbujemy poznać i zrozumieć już od wielu lat, wydając na to miliony dolarów".

Reakcja R.J. Reynolds była jeszcze bardziej dyskredytująca. W swoim publicznym oświadczeniu firma stwierdzała: „Fakt, że benzopiren wywołuje mutacje znany jest od dawna (...) Sami autorzy opisują swoje odkrycia jako przypadkowe. Medialne twierdzenia, jakoby te odkrycia były kluczowe dla wiedzy o nowotworach, płuc są przesadzone".

Co ciekawe, oświadczenie R.J. Reynolds ukazało się w przeddzień publikacji artykułu Pfeifera i Denissenki, co jasno wskazuje, że firma wiedziała wcześniej o planach jego ogłoszenia.

W następnym roku Pierre Hainaut i Tina Hernandez-Boussard, jego koleżanka z IARC, przeprowadzili szczegółową analizę wszystkich opisanych w bazie danych przypadków mutacji genu p53 u palaczy. W podsumowaniu opublikowanym w „Environmental Health Perspective" przedstawili takie same wnioski jak Pfeifer i Denissenko, a mianowicie, że na wszystkich mutacjach znaleźli ślady BPDE. „Wydawało nam się wówczas, że to wystarczy" – mówi Hainaut w trakcie naszego spotkania w Lyonie, w jego domu z widokiem na odległe ośnieżone Alpy. Opowiada mi o roli bazy danych mutacji w ujawnianiu przyczyn nowotworów. „Mieliśmy wyniki doświadczeń. Wiedzieliśmy,

która substancja wywołuje mutację. W laboratorium mogliśmy dokładnie zaobserwować działanie tej substancji i mieliśmy dowody na to, że ludzie, którzy byli narażeni na działanie tej substancji w prawdziwym życiu, mieli takie same mutacje w tych samych miejscach".

Hainaut i Pfeifer byli przekonani, że ich artykuły będą stanowić niepodważalny argument. Jakież było ich zaskoczenie, gdy dwa lata później ukazały się kolejno dwie publikacje podważające ich odkrycia, określające je mianem „nadinterpretacji". „Ich autorzy dokonali własnej analizy danych zgromadzonych w naszej bazie i na tej podstawie próbowali udowodnić, że się mylimy, że tak naprawdę nie ma związku. Pisali, że być może tytoń pomaga w powstaniu mutacji, ale na pewno jej nie wywołuje" – wyjaśnia Hainaut. „Byłem w szoku. Ale muszę przyznać, że my, naukowcy, jesteśmy przyzwyczajeni do tego, że ufamy sobie nawzajem i raczej spodziewamy się, że nasi koledzy są uczciwi. Dlatego pierwszą reakcją na taki artykuł jest zazwyczaj niepokój i wątpliwość, że może rzeczywiście pominąłem coś istotnego albo zrobiłem jakiś błąd. Po pierwszym z tych artykułów mój dyrektor wezwał mnie do biura i powiedział: «O co tu chodzi? Masz trzy dni, żeby dostarczyć mi wszystkie swoje dane, bo jeśli coś pomyliłeś albo źle zinterpretowałeś w takiej sprawie, to może być naprawdę poważny problem». Tak więc przez jakiś czas naprawdę byłem w stresie".

Hainaut poczuł ulgę, kiedy okazało się, że przełożony potwierdził jego interpretację i zaczął się zastanawiać, kim jest autor drugiego artykułu, opublikowanego w magazynie „Mutagenesis". Wiedział, że nazywa się Thilo Paschke i pracuje w monachijskim Analytisch-Biologisches Forschungslabor.

Hainaut znika na moment w swoim gabinecie, a kiedy wraca, trzyma w ręku plastikową teczkę z plikiem pożółkłych kartek w środku – wspomnieniem ponurego dramatu, w który został wciągnięty. „Nigdy wcześniej nie słyszałem o takim naukowcu, nie czytałem żadnego jego artykułu i nie miałem pojęcia, co to za instytut, w którym on pracuje" – opowiada. „Próbowałem znaleźć tę jednostkę w internecie, ale nie mieli żadnej strony. Wszystko, co miałem, to adres w Monachium. Zadzwoniłem więc do niemieckiego biura numerów, a oni mi powiedzieli, że to jest adres Niemieckiego Stowarzyszenia Producentów Tytoniu".

„Moją pierwszą reakcją była ulga. Pomyślałem sobie: *W porządku, to jest jakiś zupełnie nieuczciwy atak na moją pracę i pewnie jakoś sobie z tym poradzę. Muszę tylko wykazać, że autorzy tych publikacji nie są tak obiektywni, jak twierdzą*".

Wtedy zaczęły wychodzić na jaw nowe fakty. W ramach ogólnej ugody pomiędzy poszczególnymi amerykańskimi stanami i największymi koncernami tytoniowymi, w 1998 roku producenci tytoniu zostali zobowiązani do upublicznienia wszystkich wewnętrznych dokumentów wykorzystanych podczas procesu. Zostały one uporządkowane i udostępnione w internecie na stronie www.tobaccodocuments. org. Na początku 2001 roku Hainaut postanowił poszukać tam jakichś informacji na temat magazynu „Mutagenesis", który zareagował „dziwnie", kiedy razem z Pfeiferem zwrócili uwagę na potencjalny konflikt interesów w przypadku Paschkego i poprosili o możliwość opublikowania polemiki z jego artykułem. Prośba została odrzucona, dlatego Hainaut, chcąc sprawdzić, czy nie kryje się za tym coś podejrzanego, wpisał do wyszukiwarki nazwisko założyciela i redaktora naczelnego magazynu, Jima Parry'ego.

Kiedy zobaczył na ekranie listę odnośników, wszystko stało się jasne.

Były tam dowody umów na badania i usługi doradcze pomiędzy Parrym i firmami BAT oraz Philip Morris obejmujące okres ponad 10 lat. Jednak najwięcej wyjaśniał list datowany na 3 sierpnia 1994 roku wysłany przez Parry'ego do jego osoby kontaktowej w firmie Philip Morris, dyrektor do spraw rozwoju i badań Ruth Dempsey, dotyczący propozycji projektu badawczego. W liście tym Parry, ówczesny profesor biochemii na Uniwersytecie Walijskim w Swansea, informował Dempsey, że „suma kosztów ogólnych w wysokości 40 proc. może zostać obniżona, jeśli pieniądze zostaną przekazane bezpośrednio do mnie jako «wkład w badania», bez szczegółowych instrukcji dotyczących wydatkowania. Słyszałem od moich kolegów, że niektóre przedsiębiorstwa chętnie korzystają z tej metody finansowania badań, rezygnując z umów, które dokładnie określają składniki i przebieg projektu".

Parry kończył swój list słowami: „Proszę o informację czy Państwa firma jest zainteresowana wsparciem dla przedstawionego projektu, pamiętając, że możemy na różne sposoby zmodyfikować jego elementy, tak aby dopasować je do Państwa zainteresowań".

Curt Harris, twórca bazy danych, a w tamtym okresie redaktor naczelny magazynu „Carcinogenesis", osobiście zaangażował się w wyjaśnienie kontrowersji. W obliczu tak oczywistych dowodów konfliktu interesów poinformował o całej sprawie Oxford University Press (OUP), które wydawało oba magazyny. W odpowiedzi Janet Boullin, dyrektor działu czasopism w OUP, napisała, że chociaż rozumie ciężar zarzutów wobec Parry'ego, to ma bardzo ograniczone pole działania, ponieważ OUP jest tylko

wydawcą, a nie właścicielem „Mutagenesis". Ale natychmiast zaostrzyła zasady dotyczące ujawniania interesów, zarówno przez redaktorów, jak i autorów pracujących we wszystkich czasopismach wydawanych przez OUP. W rezultacie Parry, który nie był na to przygotowany, zrezygnował ze swojego stanowiska. Pozostał jednak w radzie redakcji, której członkowie nie musieli podpisywać oświadczeń o braku konfliktu interesów.

Wśród upublicznionych dokumentów na temat działań firm tytoniowych Hainaut znalazł również dowody na to, że firma Philip Morris gromadziła informacje na temat instytucji, w której pracował, IARC, w której przechowywana jest baza danych. Jednak chwilowo zadowolony wynikami swojego śledztwa przekazał zebrane dowody Stantonowi Glantzowi, amerykańskiemu działaczowi antytytoniowemu.

NAUKOWCY KONTRATAKUJĄ

Stanton Glantz, specjalista kardiolog, jest profesorem medycyny na Uniwersytecie Kalifornijskim w San Francisco, dyrektorem Center for Tobacco Control and Education oraz naukowcem z długim stażem walki przeciwko branży tytoniowej. Początkowo koncentrował się na biernym paleniu, które w Stanach Zjednoczonych jest przyczyną śmierci dziesiątek tysięcy niepalących osób. Jednak jego wysiłki, by zakazać palenia w miejscach publicznych, powodowały ciągłe ataki ze strony producentów tytoniu i ich zwolenników. „Po lawinie osobistych ataków na mnie, zamieszczonych na łamach «American Smoker's Journal» oraz w publikacjach American Smoker's Alliance (utworzonego przez firmę Philip Morris) i wielu innych tego typu organizacji, otrzymałem całą serię nienawistnych e-maili" –

mówił Glantz w wywiadzie dla sieci Public Braodcatsing Service (PBS) wyemitowanym w programie „Frontline" w 1996 roku. „Oprócz e-maili dostawałem też nienawistne listy, faksy i odbierałem pełne nienawiści telefony. Nawet teraz policja przechwytuje część mojej poczty. To strasznie męczące".

12 maja 1994 roku po przyjściu do pracy Glantz znalazł na swoim biurku duże pudło zawierające kilka tysięcy stron poufnych dokumentów wewnętrznych firmy tytoniowej Brown and Williamson, spółki zależnej BAT. Nie było żadnej wskazówki, kto wysłał paczkę, tylko nazwisko „Mr. Butts" na etykiecie z adresem zwrotnym. Dokumenty obejmowały okres od końca lat 50. do połowy lat 80. i dotyczyły takich kwestii jak potencjał uzależniający nikotyny, nowotwory, a także strategie prawne i PR przedsiębiorstwa. Ponieważ nie były to tematy, które bezpośrednio interesowały Glantza, początkowo chciał przekazać dokumenty koledze, który zajmował się tymi obszarami. Jednak kiedy zaczął je przeglądać, po kilkunastu minutach nie mógł się oderwać od lektury. „Całkowicie mnie to wciągnęło, ale zupełnie się nie zastanawiałem, czy te dokumenty mogą mieć jakąś wagę polityczną lub prawną", mówił w wywiadzie dla PBS. „Zainteresowała mnie ich treść, historia, którą opowiadały aspekty naukowe. To było niewiarygodne znalezisko. Coś takiego, jakby archeolog odkrył jakiś nowy wspaniały grób w Egipcie... To naprawdę niezwykłe i zdumiewające, co działo się wewnątrz firm tytoniowych w tamtym kluczowym okresie".

Glantz pozostawił sobie dokumenty i analizował je systematycznie wraz z grupą współpracowników. Efektem była seria publikacji w czasopismach naukowych, a potem wspólnie napisana książka, *The Cigarette Papers*, wydana przez University of California Press w 1998 roku. Glantz nadal interesował się

przewrotnymi działaniami koncernów tytoniowych i kilka lat później zaangażował się w wyjaśnienie udziału producentów tytoniu w sporze na temat p53. Dodał wiele nowych szczegółów do wcześniejszych odkryć Hainauta, a następnie opisał całą historię w głośnym artykule dla magazynu „Lancet".

Artykuł zawierał całą listę nazwisk naukowców opłacanych przez koncerny tytoniowe w zamian za prowadzenie badań, których celem było obniżanie wartości dowodów potwierdzających związek między częstym paleniem tytoniu i nowotworami albo za wysyłanie listów kwestionujących takie dowody do prasy fachowej i mediów. Przeszukując informacje upublicznione przez koncerny tytoniowe w wyniku ugód, Glanz odkrył, że już na początku lat 90. BAT dostrzegły wyjątkowe znaczenie genu p53, który był przedmiotem „większej liczby artykułów naukowych niż jakikolwiek inny temat związany z rakiem". Firma monitorowała badania nad genem i naciskała opłacanych przez siebie naukowców, by gromadzili i przekazywali informacje dotyczące odkryć ich kolegów, a także w miarę możliwości dostarczali kopie przygotowywanych do publikacji artykułów. Co więcej, BAT uznawała informacje o wspieraniu określonych organizacji badawczych za poufne i informowała poszczególnych naukowców, że „mogą swobodnie publikować wyniki swojej pracy, bez dalszych konsultacji" z firmą. BAT i inne koncerny przewidywały również, że Pfeifer i Denissenko potwierdzą negatywny wpływ smoły tytoniowej na gen p53, dlatego wcześniej przygotowywały strategię, by zdyskredytować to odkrycie.

Z kolei pomysł, by podważyć interpretację danych zgromadzonych w bazie IARC, pochodził prawdopodobnie od Jima Parry'ego, który opublikował dwa krytyczne artykuły

w swoim magazynie „Mutagenesis". I chociaż Hainaut odetchnął z ulgą, kiedy odkrył dowody nieuczciwości Parry'ego, zdał sobie sprawę, że nie mógłby odeprzeć tego ataku od ręki. „Szczerze mówiąc, myślę, że koncerny tytoniowe, krytykując mnie, miały trochę racji" – przyznaje. „Dane oparliśmy na fragmentach informacji zgromadzonych w naszej bazie, a nie na badaniach, których celem było odkrycie tego, co chcieliśmy pokazać. Na przykład dane na temat osób niepalących zebraliśmy chyba z dwudziestu różnych artykułów, z których żaden z osobna nie udowadniał naszej tezy. Dopiero, kiedy połączyliśmy wszystkie te informacje mogliśmy pokazać, że mamy rację".

Hainaut i jego współpracownicy zaczęli raz jeszcze, i tym razem przeprowadzili analizę, która była wystarczająco skrupulatna i jednoznaczna, by ostatecznie potwierdzić hipotezę. „Zajęło nam to dwa lata, ale zrobiliśmy to i w 2005 roku opublikowaliśmy w «Cancer Research» artykuł podsumowujący badania" – mówi Hainaut. „Nikt teraz nie może powiedzieć, że nie ma związku między paleniem a rakiem – jest i to niepodważalny. Myślę, że mamy to już za sobą, ale wymagało to trochę wysiłku! I być może ten atak był potrzebny, bo inaczej pewnie nie zrobilibyśmy tej analizy".

Ostateczne zdemaskowanie koncernów tytoniowych ponad pół wieku od pojawieniu się pierwszych ostrzeżeń o szkodliwości palenia, było prawdziwym zwycięstwem genu p53 i organizacji zajmujących się zdrowiem publicznym. Nie była to jedyna wygrana. Baza danych mutacji p53 to bardzo bogate źródło informacji dla tropicieli raka, którzy dzięki niej mogą ciągle poszerzać listę karcynogenów, pozostawiających „odciski palców" w chorobach, które wywołują. Oprócz tytoniu, który pozostawia ślad w nowotworach płuc, kolejnych dwóch przykładów

bezpośredniego oddziaływania karcynogenów [na organizm] dostarczyły odkryte przez naukowców ślady spleśniałych orzeszków ziemnych w raku wątroby i promieni słonecznych w nowotworach skóry.

ROZDZIAŁ 15

Tropiąc odciski palców

...w którym dowiadujemy się, że mutacja genu p53 (na którym można znaleźć unikalne „odciski palców" sprawcy choroby) występuje nie tylko w raku płuc, lecz także w innych rodzajach nowotworów, na przykład wątroby lub skóry.

* * *

W świecie nauki najbardziej ekscytującym zwrotem, który zapowiada większość doniosłych odkryć, wcale nie jest „Eureka!" (Znalazłem!), tylko: „To zabawne, ale...".

Issac Asimov[34]

Rak wątroby to siódmy najczęściej występujący rodzaj nowotworu na świecie, ale w takich rejonach jak Azja Południowo-Wschodnia, czy Afryka Subsaharyjska, gdzie występuje większość przypadków, zabija on więcej ludzi niż jakikolwiek inny typ raka. Na tych obszarach bardzo rozpowszechniony jest wirus zapalenia wątroby typu B (HBV), główny czynnik ryzyka zachorowania na raka wątroby. Wirus przenoszony jest przez kontakty seksualne lub przez krew, podobnie jak HIV. I tak samo jak HIV, może przez długi czas siać spustoszenie w organizmie nieświadomego gospodarza, a także

może występować lokalnie w niewielkich społecznościach. Zazwyczaj HBV potrzebuje kilku lat, by doprowadzić do powstania nowotworu, ale w krajach, w których występuje on najczęściej, w Afryce i Azji, ryzyko zachorowania jest dodatkowo spotęgowane przez inny czynnik rakotwórczy – aflatoksyny. Aflatoksyna to trucizna wytwarzana przez grzyby z rodzaju Aspergillus, rozwijające się na orzechach ziemnych oraz zbożu, przechowywanych w ciepłych, wilgotnych pomieszczeniach bez odpowiedniej wentylacji.

Aflatoksyna jest znanym karcynogenem i był to jeden ze związków chemicznych badanych w laboratorium Curta Harrisa na przełomie lat 80. i 90. XX wieku pod kątem mechanizmów działania w ludzkich komórkach. Harris odkrył, że aflatoksyna, podobnie jak obecny w smole tytoniowej BaP, jest w komórkach metabolizowana i przekształcana w substancję, która wiąże się z DNA i wywołuje mutacje. Ale dopiero dzięki jego współpracy z naukowcami z Chin i analizie mutacji genetycznych występujących w nowotworach wątroby w rejonie Qidong na północnym brzegu rzeki Jangcy, naprzeciwko Szanghaju, udało się zaobserwować działanie trucizny w warunkach naturalnych i wykazać, że genem, który ulega mutacji jest p53. Zachorowalność na raka wątroby na tym obszarze była wyjątkowo wysoka, podobnie, jak ekspozycja mieszkańców na działanie aflatoksyny zawartej w orzechach ziemnych, zbożach i fasoli, stanowiących istotne elementy lokalnej diety. Prowadzących badania naukowców uderzyła również częstotliwość niezwykłych mutacji genu p53 w kodonie 249. Polegała ona na zastąpieniu guaniny (G) przez tyminę (T) – tak jak w przypadku mutacji wywołanej przez smołę tytoniową.

Występowała jednak w innym miejscu [ang. *hot spot*]. Czyżby była śladem pozostawianym przez aflatoksynę?

Kiedy artykuł opisujący odkrycia Harrisa i jego kolegów, sugerujący taką możliwość, był już gotowy, jeden z naukowców odwiedzających laboratorium wspomniał przypadkowo o innej grupie badaczy, pracującej w Republice Południowej Afryki (RPA). Oni również zaobserwowali niezwykłą mutację genu p53 w nowotworach wątroby, ale nie byli pewni znaczenia swojego odkrycia. Nie wiedzieli też, jak je wykorzystać. Zdając sobie sprawę, że [dzięki temu odkryciu] można potwierdzić hipotezę o istnieniu bezpośredniego związku między aflatoksyną i mutacją p53 w raku wątroby, Harris wysłał do Afryki drugi zespół, kierowany przez Mehmeta Ozturka, celem jak najszybszego opisania tamtych badań. Chciał, by oba artykuły ukazały się równocześnie. Ostatecznie tak właśnie się stało, oba teksty zostały opublikowane w jednym numerze magazynu „Nature", w kwietniu 1991 roku.

Z czasem zaczęło się pojawiać coraz więcej doniesień o związku ekspozycji na aflatoksyny z określonym typem mutacji p53. Płynęły one głównie z ciepłych, wilgotnych obszarów, gdzie warunki przechowywania zbóż pozostawiały wiele do życzenia. Ciągle jednak nikt nie wiedział, co [pod wpływem aflatoksyny] zachodzi wewnątrz komórki. Wśród naukowców poszukujących odpowiedzi na to pytanie był Pierre Hainaut. Pomimo okazywanej początkowo rezerwy – w związku z wcześniejszymi kontrowersjami wokół roli tytoniu w powstawaniu nowotworów płuc – Hainaut, urodzony detektyw, postanowił udać się na pierwszą linię frontu, czyli tam, gdzie nieprawidłowe funkcjonowanie genów supresorowych odbija się na życiu prawdziwych ludzi. Była to jego ulubiona metoda pracy i już

wcześniej tropił ślady rozmaitych mutacji p53 w wielu krajach na całym świecie, od Chin po Brazylię, od Iranu po zachodnią Afrykę i południowo-wschodnią Azję. Tym razem prowadził swoje badania głównie w Mali, Gambii i Tajlandii – trzech krajach, w których nowotwory wątroby stanowią naprawdę olbrzymi problem. W ciągu kilku lat pracy Hainaut oraz inni naukowcy zajmujący się tą kwestią, w tym również Harris i Pfeifer, ujawnili niebezpieczny związek między aflatoksyną, wszechobecnym wirusem HBV oraz p53, które wspólnie wywołują raka wątroby.

Najpierw badacze ustalili, w jaki sposób sam wirus HBV może doprowadzić do powstania nowotworu. Gen wirusowy – znany po prostu jako „x", gdyż przez długi czas nikt nie miał pojęcia, jak działa – koduje białko o podwójnej funkcji. Jeden koniec tego białka stymuluje proces dzielenia się zainfekowanych komórek, a drugi wywołuje apoptozę, czyli ich obumieranie. W ten sposób wirus próbuje utrzymać swego rodzaju równowagę w populacji komórek zakażonych. Jednak, ponieważ wirus działa w cyklach, w których najpierw występuje stan zapalny, potem dochodzi do uszkodzeń, a na końcu następuje naprawa komórek, cały proces prowadzi ostatecznie do marskości wątroby – organ jest powiększony i zniekształcony przez blizny i guzki regeneracyjne.

„Te cykle niszczenia i regenerowania wątroby mogą powtarzać się przez jakiś czas i niekiedy prowadzą do śmierci – ludzie umierają na marskość wątroby nawet bez rozwinięcia się nowotworu" – wyjaśnia Hainaut. „Jednak w pewnym momencie, nawet bez mutacji p53, u ludzi cierpiących na chroniczne dolegliwości i marskość wątroby gen HBx może zostać przypadkowo włączony do genomu komórek wątroby. W tym momencie traci swoją część odpowiadającą za apoptozę

i pozostaje z fragmentem pobudzającym podział. Komórki przestają obumierać i powstaje nowotwór. W taki sposób rak może się rozwinąć w następstwie marskości, nawet jeśli p53 nie ulega mutacji".

Z kolei zespół Harrisa odkrył, że w ten sam sposób jak [wirus] SV40 łączy się z p53, białko HBx łączy się z p53, tworząc nowe złożone białko. Członkowie zespołu uznali, iż HBx ogranicza tym samym funkcję p53 jako genu supresorowego, sprzyjając rozwojowi nowotworu. Jednak niedawne badania przeprowadzone przez Hainauta i jego współpracowników w Afryce Zachodniej wskazują, że założenie to było błędne. W rzeczywistości relacja między białkami jest prawdopodobnie odwrotna. Wygląda na to, że to p53 blokuje zdolność białka wirusowego HBx do indukowania procesu apoptozy, pozostawiając nietkniętą funkcję inicjowania proliferacji komórek. Kluczową kwestią jest fakt, że w warunkach naturalnych związek między p53 i HBx, który ma wpływ na funkcjonowanie białka wirusowego, jest silny tylko wówczas, kiedy p53 ulegnie mutacji na kodonie 249, spowodowanej działaniem aflatoksyny. Wtedy hamulce przestają działać i wątroba staje się bezbronna wobec raka. „Ryzyko zachorowania na raka wątroby u osób, które są długotrwałymi nosicielami HBV, jest około 5–7 razy większe niż u osób, u których ten wirus nie występuje" – mówi mi Hainaut. „Ryzyko wystąpienia raka tylko z powodu działania aflatoksyn jest bardzo trudne do określenia, ale prawdopodobnie jest ono co najwyżej dwukrotnie większe. Jednakże u osób, u których występują oba czynniki, zagrożenie jest dwudziestokrotnie, a nawet, jak sugerują niektóre badania, sześćdziesięciokrotnie większe niż przeciętnie. Tak więc, ryzyko jest naprawdę zwielokrotnione".

Odkrycie, że to zmutowane p53 wpływa na funkcjonowanie wirusa, a nie odwrotnie, pomogło również w wyjaśnieniu pewnej zagadki związanej ze specyficznymi cechami raka wątroby u pacjentów w Afryce. Zazwyczaj, kiedy u osoby zarażonej wirusem HBV pojawia się nowotwór wątroby, ma ona już objawy zaawansowanej marskości, będącej skutkiem powtarzających się na przestrzeni wielu lat uszkodzeń i napraw. „W świecie zachodnim jest to reguła. Przypadki, w których rak wątroby nie jest następstwem marskości, są naprawdę rzadkie" – mówi Hainaut. Obserwacje badaczy pokazały, że sytuacja jest zupełnie inna wśród chorych na raka wątroby mieszkających w Afryce. I to, mimo że większość z nich choruje przewlekle na zapalenie wątroby. „Powiedziałbym, że marskość wątroby poprzedza raka u około 15 proc. tych pacjentów. U wielu osób pojawia się później, w okresie gwałtownego podziału komórek rakowych jako swego rodzaju wtórna reakcja tego organu na przewlekły stan zapalny, ale bardzo rzadko występuje przed rakiem".

Zgodnie z teorią Hainauta, zmutowany p53, blokując zdolność wirusa do indukowania apoptozy, zapobiega powtarzającym się cyklom zapaleń, uszkodzeń i napraw prowadzącym do marskości wątroby. W ten sposób, paradoksalnie, działanie aflatoksyny chroni ludzi zakażonych wirusem HBV, często przez wiele lat, aż do czasu, kiedy wskutek innych zdarzeń lub czynników zostaną zaatakowani przez nowotwór. „Nie mogliśmy zrozumieć, dlaczego w tych społecznościach przypadki marskości wątroby występują tak rzadko. Zaobserwowałem to już 15 lat temu, mieliśmy naprawdę bardzo niewielu takich pacjentów. Pytając o to, słyszeliśmy zazwyczaj: «Bo ich nie szukacie... Oni nie zgłaszają się do lekarza, więc wykrywalność jest niewielka... Diagnozy nie są

prawidłowe...» itd. Ale od tamtego czasu przeprowadziliśmy wiele badań kohortowych (obejmujące grupę ludzi, których łączą wspólne cechy i sposób życia) i wciąż widzimy, że większość pacjentów, u których diagnozujemy raka wątroby, nie ma żadnych śladów wcześniejszej marskości".

Hainaut i jego współpracownicy zaobserwowali takie samo zjawisko wśród cierpiących na nowotwory wątroby pacjentów z Tajlandii. Ci, u których stwierdzono spowodowaną aflatoksyną mutację p53 i zakażenie wirusem HBV, nie wykazywali żadnych objawów marskości. Jednak niedawne doświadczenia Hainauta w Mali przypadkowo wykazały, że choć zmutowany przez aflatoksynę gen p53 może w krótkim okresie chronić wątrobę, to ogólnie, ograniczenie oddziaływania niebezpiecznego grzyba ma ogromny wpływ na zmniejszenie zachorowalności na nowotwory wątroby. Analizując, wraz z zespołem, rejestry zachorowań na nowotwory w stolicy Mali, Bamako, Hainaut zauważył, że liczba przypadków raka wątroby gwałtownie spadła. W ciągu ostatnich 15 lat, począwszy od drugiej połowy lat 90., liczba zachorowań zmniejszyła się o około 75 procent. Początkowo badacze podejrzewali jakieś nieścisłości lub manipulacje w rejestrach, jednak nie znaleźli nic, co pomogłoby im wyjaśnić tak poważne zmiany.

Badając sprawę dalej, naukowcy odkryli, że w połowie lat 90. ministerstwo rolnictwa Mali podjęło działania zapobiegające skażeniu miejscowych zbóż aflatoksyną. Podstawową motywacją nie było jednak zdrowie publiczne, lecz względy ekonomiczne. Rząd Mali chciał eksportować zboże jako paszę dla zwierząt i musiał w tym celu spełnić wymagania wynikające z międzynarodowych przepisów. Miało to jednak daleko idące konsekwencje również dla obywateli tego kraju, jak twierdzi

Hainaut. „Po pierwsze zmniejszyło się skażenie żywności, a po drugie większość zbóż przeznaczona została na eksport, co spowodowało w społeczeństwie zmianę sposobu żywienia". Dziś mieszkańcy Mali są tylko w niewielkim stopniu narażeni na działanie aflatoksyn, co jest szczególnie widoczne, gdy przyjrzeć się sytuacji w sąsiedniej Gambii, w której zachorowalność na raka wątroby wciąż pozostaje bardzo wysoka.

Sytuacja ta jednak ma również ciemną stronę. Tak jak przewidywali Hainaut i jego koledzy, lekarze w Mali odnotowują coraz więcej przypadków marskości wątroby, ponieważ zapalenie wątroby typu B jest nadal powszechnym schorzeniem, a czynnik, który ograniczał jego skutki – wywołana aflatoksyną mutacja p53 – występuje znacznie rzadziej.

Właśnie ta cecha epidemiologii molekularnej – możliwość jej szybkiego i bezpośredniego wykorzystania w prawdziwym życiu – pociąga tak bardzo wszystkich, którzy zajmują się tą dziedziną. Znakomicie ilustruje to powyższa historia. Po wyjaśnieniu związków między aflatoksyną, genem p53 a wirusem żółtaczki typu B, naukowcy odkryli również, że mogą się dowiedzieć bardzo wiele na temat procesów i zmian zachodzących w wątrobie, wykonując badanie krwi. „Chodzi o to, że materiały usunięte z wątroby dostają się albo do żółci, albo do krwi. Nie mogą trafić gdzie indziej. Nie ma tu bezpośredniej drogi do świata zewnętrznego, takiej jak układ trawienny lub płuca" – wyjaśnia Hainaut. „Oznacza to, że każdy fragment DNA z komórek wątroby ląduje w krwiobiegu. A wątroba jest tak dużym narządem, że znaczna część z krążącego we krwi DNA pochodzi właśnie stamtąd".

Naukowcy opracowali metody odzyskiwania tego DNA i badania go na obecność zmutowanego pod wpływem

aflatoksyny p53. Potrafią również monitorować składniki genomu wirusa HBV i sprawdzać, co się dzieje z genem HBx. Niestety, wciąż nie udało się opracować równie prostego testu dla raka skóry, choć także w jego przypadku karcynogen (promienie słoneczne) pozostawia na p53 wyraźne „odciski palców". Ludzie muszą sami nauczyć się rozpoznawać symptomy choroby.

ODCISKI PALCÓW SŁOŃCA

Miałam siedem lat, kiedy mój ojciec otrzymał propozycję pracy na Borneo, gdzie miał kierować przychodnią dla gruźlików i szpitalem służącym lokalnej społeczności Dajaków. Cała rodziną wypłynęliśmy z Liverpoolu i do dziś doskonale pamiętam dni spędzone na pokładzie, na pełnym morzu, pod błękitnym niebem i w palącym słońcu. Wszyscy byliśmy poparzeni i mieliśmy ogromne bąble na ramionach, które bardzo bolały, kiedy się ich dotykało i zmuszały nas do spania na brzuchu, z szeroko rozłożonymi rękami. Na koniec skóra schodziła płatami, jak tapeta ze ścian. Tylko nos mojej siostry nie chciał się zagoić. Na wszystkich zdjęciach z tamtego okresu ma na nim ogromny plaster. W tamtym czasie, w latach 50. XX wieku, i długo później, nie mieliśmy pojęcia, na jakie ryzyko się narażamy, nie chroniąc się odpowiednio przed słońcem.

Dziś wiemy, że promieniowanie ultrafioletowe (UV) jest główną przyczyną nowotworów skóry, a na początku lat 90. Douglas Brash i jego zespół z Uniwersytetu Yale odkryli, że uszkadza ono również gen p53, pozostawiając na nim „odciski palców" w postaci charakterystycznej mutacji. Kiedy pod koniec lat 80. Brash rozpoczął swoje badania nad wpływem promieniowania UV, rozpoznanego już wówczas jako karcynogen,

istniały trzy główne teorie dotyczące tego, w jaki sposób wywołuje ono nowotwory w komórkach skóry. Pierwsza z nich głosiła, że promieniowane UV zakłóca działanie układu odpornościowego tak, aby nie usuwał on uszkodzonych komórek z powierzchni skóry. Druga, że światło słoneczne bezpośrednio stymuluje wzrost komórek i trzecia, że promieniowanie uszkadza DNA, usuwając jakiś niezwykle istotny gen lub geny.

Kilka pracujących niezależnie zespołów, prowadzących w Europie i Stanach Zjednoczonych badania nad nowotworami skóry, odkryło, że promienie UVB są absorbowane najszybciej przez komórki nabłonkowe – płaskie, okrągłe komórki znajdujące się tuż pod powierzchnią skóry, a nieco wolniej przez komórki podstawne naskórka – znajdujące się głębiej, a jednocześnie najczęściej atakowane przez nowotwór (w tamtym okresie wpływ promieni słonecznych na melanocyty, komórki atakowane przez czerniaka, najrzadszą, ale najbardziej śmiertelną odmianę raka skóry, nie był jeszcze znany). Badacze odkryli również, że promieniowanie UVB uszkadza DNA i to w bardzo określony sposób. Zawsze uderza w miejsce na nici DNA, w którym obok siebie występują dwie zasady, cytozyna (C) oraz tymina (T), odwracając je tak, że C zastępowana jest przez T, a czasami dwa C przez dwa T. Wywołuje to drobną, ale zasadniczą zmianę w strukturze białka wytwarzanego przez nić DNA. Taka mutacja nie pojawia się w żadnym z nowotworów występujących w innych miejscach w ludzkim ciele, do których nie dociera światło słoneczne. Dlatego uznano ją za „odcisk palca" promieniowana UVB.

U ludzi, podobnie jak u innych żywych organizmów, mutacje i uszkodzenia DNA pojawiają się przez cały czas, na każdym etapie życia. Mutacje umożliwiają ewolucję i przystosowanie

do środowiska, mogą więc wywoływać zarówno dobre, jak i złe skutki. Dlatego Brash zdawał sobie sprawę, że sam fakt, iż UVB powoduje mutację, wcale nie musi automatycznie oznaczać, że jest sprawcą raka skóry. Jednak ogólny model przebiegu choroby – a szczególnie dowody pochodzące z Australii, w której, obok Nowej Zelandii, notuje się najwięcej na świecie przypadków zachorowań – przekonał go, że powinien zacząć od sprawdzenia hipotezy uszkodzonych genów.

Nowotwory skóry rozwijają się najczęściej w średnim wieku lub nawet później. Australijscy badacze zauważyli, że wskaźniki zachorowalności wśród imigrantów o jasnej skórze – najczęściej przybyszów z Wielkiej Brytanii i północnej Europy – którzy trafili do Australii jako dorośli, były znacząco niższe niż wśród tych, którzy zjawili się tam będąc dziećmi. Jeśli chodzi o tę pierwszą grupę, zachorowalność była porównywalna ze wskaźnikami w ich krajach ojczystych, podczas gdy u tych, którzy mieszkali w Australii od dzieciństwa, wskaźniki były takie, jak u rodowitych Australijczyków. Sugerowałoby to, że wywołane przez promieniowane UV uszkodzenie skóry, które spowodowało rozwój nowotworu w późniejszym wieku, musiało się wydarzyć znacznie wcześniej. W związku z tym ludzie, którzy przebywali w kraju najdłużej, w sposób oczywisty byli bardziej narażeni na konsekwencje działania palącego australijskiego słońca od tych, którzy większość życia spędzili pod zachmurzonym niebem północnej Europy.

Brash doszedł do wniosku, że gdyby promieniowanie atakowało układ odpornościowy lub bezpośrednio uruchamiało niekontrolowany podział komórek, efekty pojawiałyby się znacznie szybciej i przemijały po pewnym czasie, a wiek przyjazdu do kraju nie miałby znaczenia dla poziomu ryzyka.

Fakt, że jednak miał znaczenie, wskazywał, że najbardziej prawdopodobną przyczyną jest mutacja genu, która ujawnia się po dłuższym czasie i wywołuje długotrwałe skutki. Zadaniem Brasha było więc ziedntyfikowanie zaatakowanego genu. Była to praca przypominająca szukanie igły w stogu siana. Działo się to jeszcze zanim ukończono sekwencjonowanie ludzkiego genomu, w czasach gdy naukowcy powszechnie sądzili, że składa się on z przynajmniej 100 tys. genów, a nie, jak się okazało, niespełna 30 tysięcy.

Brash i jego zespół sprawdzili kilka mylnych tropów, poszukując przede wszystkim onkogenów, zanim dopisało im szczęście. Pewnego dnia w Yale pojawił się Arnie Levine, by wygłosić wykład, w którym wspomniał o wykryciu mutacji genu p53 w różnych typach nowotworów. Brash słuchał tego wykładu i nagle wszystkie elementy zaczęły mu się składać w jedną całość. Gen supresorowy był znacznie lepszym podejrzanym o wywoływanie raka skóry niż onkogeny, ponieważ by doszło do uzłośliwienia [komórki], uszkodzeniu muszą ulec oba allele supresora (wykorzystując porównanie z Rozdziału 7, można powiedzieć, że zepsuć muszą się oba hamulce samochodu). Oba te wydarzenia mogą dzielić od siebie nawet dekady, co wyjaśniałoby długi okres rozwoju nowotworu, który często pojawia się wiele lat po tym, jak ofiara doznała pierwszego poparzenia słonecznego.

Istniała jeszcze jedna intrygująca poszlaka, wskazująca na to, że mutowanym genem jest właśnie p53. U osób cierpiących na niezwykle rzadką chorobę skóry, nazywaną dysplazją Lewandowsky'ego-Lutza, na skórze rąk i nóg pojawiają się brodawkowate narośle, które mogą się powiększać i pod wpływem słońca przekształcać w nowotwory. Chorobę

Lewandowsky'ego-Lutza wywołują pewne szczepy wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV), o którym wiadomo, że atakuje i niszczy białko p53, a także, że prowadzi do powstawania nowotworów innych narządów, na przykład szyjki macicy.

Zespół Brasha rozpoczął badania od wyciągnięcia z archiwum medycznego zgromadzonych tam fragmentów tkanek z nowotworów skóry niebędących czerniakami, pobranych od pacjentów z Nowego Jorku i Uppsali (Szwecja), gdzie pracował Jan Pontén, naukowiec, który zainteresował się projektem i postanowił dołączyć do grupy. Wszystkie próbki guzów pochodziły z tych miejsc na ciele, które są eksponowane na działanie słońca – twarzy czy dłoni. Badacze wyekstrahowali DNA z każdego guza, a następnie wyizolowali gen p53, by sprawdzić, czy uległ on mutacji. Odkryli, że mutacje wystąpiły w 90 proc. przypadków. Większość z nich miała na sobie „odciski palców" promieniowania UV i w związku z tym mogła wytwarzać aktywne białka o charakterystycznej zmienionej strukturze. Brash i jego współpracownicy opisali swoje odkrycia w „PNAS" w 1991 roku. Wszystko to jednak działo się w okresie, kiedy nikt jeszcze nie wiedział dokładnie, jak funkcjonuje typ dziki p53. Musiało upłynąć jeszcze kilka lat – a różne zespoły musiały przeprowadzić wiele badań – by naukowcy mogli uzyskać pełny obraz sytuacji, zarówno prawidłowej reakcji organizmu na promieniowanie słoneczne, jak i nieprawidłowości, które muszą zaistnieć, by doszło do rozwoju nowotworu. W skrócie, wygląda to tak, że osoby, u których rozwija się rak skóry, w pewnym momencie swojego życia, najprawdopodobniej w dzieciństwie, doznają oparzenia słonecznego wywołującego w jakiejś komórce lub komórkach mutację genu p53. Wiemy dziś, że promieniowanie UV powoduje poważne uszkodzenia naszego

DNA, ale ludzkie ciało wyposażone jest w mechanizmy, które umożliwiają naprawę tych uszkodzeń, jeśli nie są one zbyt poważne. Enzymy w naszych komórkach wycinają uszkodzony fragment i zastępują go zdrową kopią. Jednak mechanizm ten czasem się zacina i gen ulega mutacji w punktach zapalnych, czyli w tych miejscach, w których z jakiegoś powodu proces naprawy nie był w pełni skuteczny.

Pamiętny eksperyment Petera Halla i Davida Lane'a, w którym panowie naświetlali rękę Halla, pokazał, że p53 aktywuje się w skórze, kiedy przebywamy na słońcu. W późniejszych latach inni naukowcy odkryli, że w normalnej sytuacji aktywowane białko p53 wywołuje apoptozę komórek, w których nie da się naprawić DNA uszkodzonego przez promieniowanie. Jednak komórka, w której uszkodzeniu uległ sam p53, nie wejdzie na drogę apoptozy. Zacznie się reprodukować, przekazując mutację następnym generacjom aż do czasu, gdy kolejne podrażnienie skóry spowoduje uzłośliwienie.

Według Brasha, w takich sytuacjach światło słoneczne szkodzi podwójnie. Zbuntowana komórka ze zmutowanym p53 otoczona jest przez zdrowe komórki, które, uszkodzone przez promieniowanie, zareagują tak jak powinny, czyli popełniając samobójstwo. W ten sposób zła komórka zyska dodatkową przestrzeń do wzrostu. „Wywołując samobójstwo zdrowych komórek, promieniowanie słoneczne wspiera proliferację zmutowanych komórek" – pisał Brash w artykule dla „Scientific American" napisanym wspólnie ze specjalistą w dziedzinie raka skóry Davidem Leffellem. „W efekcie światło słoneczne dwukrotnie przyczynia się do powstania raka: wywołując mutację genu p53, a następnie stwarzając warunki dla nieograniczonego podziału zmutowanych komórek". I w tym tkwi

istota problemu, bo to właśnie ekspansja klonów zmutowanej komórki prowadzi do rozwoju nowotworu.

„Większość ludzi nie zdaje sobie sprawy, że dla nowotworu możliwość ekspansji jest znacznie ważniejsza niż pierwotna mutacja. Jeśli wystawimy się na działanie słońca pięć razy, możemy wywołać pięć razy więcej mutacji, ale jeśli pięć razy zainicjujemy ekspansję komórek ze zmutowanym genem p53, to zmutowanych komórek uzyskamy w efekcie znacznie więcej. To jak składane odsetki bankowe[35] – taki gwałtowny wzrost w krótkim okresie może doprowadzić do powstania ogromnej liczby komórek tego rodzaju" – przekonuje Brash. Wywoływane w ten sposób zmiany przedrakowe stają się bardzo łatwym celem dla mutagenów, w tym przypadku dla promieniowania UVB, które zadają komórkom ze zmutowanym p53 kluczowy „drugi cios" i zamieniają je w komórki rakowe.

* * *

Opisane powyżej mutacje to mutacje somatyczne – występujące spontanicznie w pojedynczych komórkach, w dowolnym momencie życia człowieka. Czasami takie mutacje zachodzą w plemnikach lub komórkach jajowych i wówczas zmutowany gen może zostać przekazany następnym pokoleniom. Taki rodzaj mutacji nazywamy mutacją germinalną lub dziedziczną. Dla osoby dziedziczącej oznacza to złe wieści, ponieważ każda komórka w jej ciele zawiera w sobie zmutowany gen.

ROZDZIAŁ 16

Rak w rodzinie

W tym rozdziale:
a) dowiadujemy się o istnieniu rodzin, w których wyjątkowa podatność na nowotwory spowodowana jest mutacją genu p53 we wszystkich komórkach ciała przekazywanych następnym pokoleniom w plemnikach lub komórkach jajowych,
b) poznajemy doktorów Fraumeniego i Li, którzy jako pierwsi rozpoznali zespół chorobowy, nazwaną później od ich nazwisk.

* * *

Kiedy leczy się pacjenta chorego na nowotwór, wszystko ukierunkowane jest na niego: terapia, prognozy i ścieżka powrotu do zdrowia. Rodzina otrzymuje tylko wsparcie. U nas rodzina jest częścią choroby – więc wszystko jest bardziej złożone. Nie mamy do czynienia z jedną osobą i jednym rodzajem osobowości, emocji i zachowań. Musimy sobie radzić z reakcjami wszystkich członków rodziny.

Patricia Ashton-Prolla[36]

John Berkeley był małym chłopcem mieszkającym na obrzeżach Bostonu. Pewnego dnia podczas zabawy w ogrodzie potknął się, wywrócił i uderzył głową w coś twardego. W rezultacie w tylnej

części głowy chłopca pojawił się niewielki guz. Kiedy po kilku dniach okazało się, że guz nie znika, rodzice zabrali Johna do lekarza, który stwierdził u niego mięsaka komórek prążkowanych, rzadki rodzaj nowotworu rozwijającego się w mięśniu przyczepionym do kości u podstawy czaszki. John miał wówczas cztery lata. Przez kolejne dwa i pół roku był stałym pacjentem bostońskiego Dana-Farber Cancer Institute (nazywanego wówczas Sidney Farber Cancer Institute). Leczono go również w specjalistycznym ośrodku Jimmy Find Clinic, który nosił imię chłopca chorego na chłoniaka jelita [cienkiego], który pod koniec lat 40. ubiegłego wieku stał się twarzą kampanii na rzecz budowy centrum badań nad nowotworami dziecięcymi.

John przeszedł zabieg usunięcia z czaszki guza wielkości piłki golfowej, a następnie trwającą niemal rok radioterapię. „Pamiętam, jak leżałem na stole, a oni dosłownie przyklejali mnie do niego taśmą klejącą, żeby mnie unieruchomić" – opowiada mi w trakcie rozmowy telefonicznej. „Wiem, że trudno utrzymać dziecko bez ruchu podczas takiego zabiegu, ale to strasznie nieprzyjemne uczucie, być przyklejonym do stołu taśmą, zwłaszcza w tym wieku".

Częścią jego leczenia była również chemioterapia, która wymagała codziennych wizyt w ambulatorium, gdzie podłączano go na osiem godzin do kroplówki z osłabiającym koktajlem z leków. „Pod koniec terapii byłem już w wieku, w którym idzie się do zerówki. Tymczasem straciłem wszystkie włosy i byłem zupełnie łysy, a jak wiadomo, dzieci potrafią być okrutne. Tak właśnie było w moim przypadku. Dokładnie pamiętam, jak koledzy w szkole wytykali mnie palcami" – mówi John.

Próby utrzymania Johna przy życiu pomimo negatywnych prognoz, oznaczały karuzelę emocjonalną także dla jego rodziców.

„Dowiedziałem się później, że ich małżeństwo wisiało na włosku" – wspomina. „W latach 70. leczenie nowotworów wyglądało zupełnie inaczej niż dziś. Trudno było o jakiekolwiek wsparcie. Rodziny dotknięte chorobą były traktowane – nie boję się użyć tego określenia – w sposób barbarzyński. Pacjent wzywany był na kurację, przechodził zabieg, a następnie wysyłano go do domu. Nie było mowy o przyjaznej atmosferze, wspieraniu rodzin czy jakimkolwiek łagodzeniu stresu".

Powrót chłopca do zdrowia nie oznaczał dla Berkeleyów końca kłopotów. John miał brata, który urodził się mniej więcej w tym czasie, gdy zaczynała się jego terapia. Dziwnym zbiegiem okoliczności historia powtórzyła się w przypadku brata Johna. Pewnego razu, gdy starszy z chłopców miał dziesięć, a młodszy sześć lat, grali w baseball z kolegami. Jeden z graczy uderzył piłkę tak nieszczęśliwie, że trafiła młodszego Berkeleya w nogę. Tym razem opuchlizna również nie chciała zejść i kiedy zaniepokojeni rodzice zabrali syna do szpitala, by sprawdzić, co się dzieje, dowiedzieli się, że to kostniakomięsak – nowotwór kości – i że trzeba będzie chłopcu amputować nogę.

„Kolejnym zdarzeniem, po którym zapaliło nam się czerwone światełko, była choroba mojego ojca, u którego po czterdziestce pojawiły się jakieś guzy tkanek miękkich" – wspomina John Berkeley. Historia chorób tej rodziny zwróciła uwagę specjalistów w Dana-Farber Institute. Były wczesne lata 90., więc naukowcy i lekarze wiedzieli już o genetycznych uwarunkowaniach nowotworów. Poza tym, członkiem zespołu opiekującego się rodziną Berkeleyów był młody amerykański onkolog i epidemiolog chińskiego pochodzenia, Frederick Li, którego szczególnie interesowały przypadki występowania nowotworów w rodzinach. Właśnie od jego nazwiska, a także od nazwiska

epidemiologa pracującego w Narodowych Instytutach Zdrowia, Josepha Fraumeniego, nazwano – opisany przez nich – zespół predyspozycji do nowotworów.

W przeważającej liczbie przypadków osoby z zespołem Li-Fraumeni, nazywanym w skrócie LFS, rodzą się z mutacją genu p53 we wszystkich komórkach ciała. Jest to tak zwana mutacja germinalna, która zachodzi w komórkach jajowych lub plemnikach i jest przekazywana z pokolenia na pokolenie przez rodziców – ich potomstwo jest szczególnie narażone na rozwój nowotworu praktycznie w każdym wieku.

Berkeleyowie zostali pacjentami poradni genetycznej. U wszystkich trzech, którzy zachorowali na raka, przeprowadzono specjalne badania, które wykazały mutację genu p53. Brat Johna zginął w spowodowanym atakiem padaczki wypadku samochodowym w 2004 roku. Ojciec, po stoczeniu kilku bojów z mięsakiem, zmarł na raka trzustki w 2007 roku. Trzy lata później John znalazł się w niewielkiej grupce założycieli Li-Fraumeni Syndrome Association – działającego w internecie stowarzyszenia oferującego wsparcie ludziom, którzy na co dzień muszą w samotności zmagać się z nieustannym zagrożeniem ze strony nowotworu. On sam miał nawrót choroby. W 2012 roku zdiagnozowano u niego włókniakomięsaka.

NA TROPIE CHOROBY

Jo Fraumeni rozpoczął swoją karierę epidemiologa w Narodowym Instytucie ds. Raka od pracy w małym, obskurnym gabinecie nad sklepem z ubraniami, w centrum miasta Bethesda w stanie Maryland. W połowie lat 60. ubiegłego wieku epidemiologia była jeszcze bardzo młodą dyscypliną

w Narodowych Instytutach Zdrowia (NIH) i Fraumeni dzielił biuro z jednym tylko współpracownikiem, nowo zatrudnionym Bobem Millerem. Fraumeni był absolwentem medycyny Uniwersytetu Duke'a w Północnej Karolinie. Podczas stażu w szpitalu Memorial Sloan Kettering w Nowym Jorku zauważył, że ma łatwość wykrywania schematów chorobowych. Potrafił przyglądać się przypadkom pacjentów zgłaszających się do niego do poradni w szerszej perspektywie i, w poszukiwaniu przyczyn choroby, analizować szerszy kontekst – środowisko życia i pracy pacjenta oraz uwarunkowania rodzinne. Gdy podejmował decyzje dotyczące swojej kariery lekarskiej, zastanawiał się poważnie nad wstąpieniem do wojska i wyjazdem do Wietnamu. Ostatecznie jednak wybrał specjalizację z epidemiologii w NIH.

Z kolei Bob Miller był pediatrą z doktoratem z epidemiologii[37]. Obu mężczyzn połączyła prawdziwa przyjaźń. „Bob był takim trochę buntownikiem" – mówi Fraumeni. „Pamiętam, że zaraz na początku naszej znajomości pokazał mi obrazek, który miał na ścianie: oprawioną okładkę «New Yorkera». Widniały na niej mewy stojące w rzędzie na dachu jakiegoś budynku. Wszystkie, z wyjątkiem jednej, znajdującej się trochę z boku, patrzyły w tę samą stronę. Powiedział, że te, które patrzą przed siebie, są jak lekarze zastanawiający się nad diagnozą i metodami leczenia pacjenta. «My powinniśmy być jak ta» – wskazał stojącą z boku mewę. «Powinniśmy zawsze rozglądać się dookoła, by zbadać, co jeszcze dzieje się z pacjentem w jego środowisku, społeczności i w rodzinie»".

Fraumeni wciąż ma u siebie tamto zdjęcie. Wyciąga je ze stosu papierów, które przygotował w związku z moją wizytą w jego biurze w Narodowym Instytucie ds. Raka latem 2012 roku. Ma 79 lat i jest tuż przed emeryturą. Szykuje się do opuszczenia

stanowiska dyrektora Departamentu Epidemiologii i Genetyki Nowotworów, który założył 50 lat wcześniej. Departament pod jego kierownictwem rozrósł się z malutkiego pokoiku nad sklepem do dużego i prestiżowego centrum badawczego, mieszczącego się w specjalnie wybudowanym kompleksie, będącym częścią nowoczesnego kampusu położonego na przedmieściach Bethesdy. Po słonecznym, skwarnym dniu na niebie zebrały się czarne chmury i tuż po moim przyjeździe zaczyna się burza. Kiedy siedzimy w gabinecie [Jo], pełnym książek, dyplomów i nagród, gradowe kulki walą w szyby, a zerwane z drzew liście wirują na wietrze. Po chwili przerwy na refleksję Fraumeni, powściągliwy mężczyzna w okrągłych okularach, który starannie dobiera słowa, mówi: „Miałem ogromne szczęście, że poznałem Boba. Naprawdę był moją bratnią duszą".

To Miller namówił go do zainteresowania się dziecięcymi nowotworami, o których praktycznie nic nie było wiadomo, poza tym może, że szczególną skłonność do zapadania na białaczkę mają dzieci z zespołem Downa. Zainspirowani tym przykładem dwaj epidemiolodzy zaczęli poszukiwać innych schematów i połączeń rozmaitych czynników z różnymi typami nowotworów występującymi u najmłodszych pacjentów. Dzieci bardzo rzadko chorują na raka, zatem by zgromadzić dane o liczbie przypadków wystarczającej do wykrycia jakichś powtarzających się wzorców, Miller i Fraumeni musieli przewertować rejestry wielu szpitali. Ich pierwsze śledztwo dotyczyło guza Wilmsa, dziecięcego nowotworu nerek, ponieważ w czasie swoich poszukiwań natrafili aż na 440 przypadków tej choroby. Były one związane z całą „konstelacją anomalii" obejmujących wady układu moczowo-płciowego, opóźnienie fizyczne i umysłowe, a także

aniridię, czyli brak tęczówki oka u niektórych chorujących dzieci. Zaburzenie to występuje tak rzadko, że sześć przypadków, które badacze zidentyfikowali w swojej próbie stanowiło niezwykły statystyczny wynik. Oznaczało częstotliwość występowania tej wady ponad 1 tys. razy wyższą niż w całej populacji, a tym samym wyraźnie sugerowało związek z guzem.

„Byliśmy tym wszystkim bardzo podekscytowani i przeanalizowaliśmy wszystkie typy dziecięcych nowotworów" – opowiada Fraumeni. „Odkryliśmy nie tylko związki między nowotworami i anomaliami, ale także między samymi nowotworami. U dzieci chorych na jeden rodzaj raka czasami pojawiał się inny nowotwór, nie mający związku z pierwszym. Zauważyliśmy, że niektóre z nich wynikały z rodzaju zastosowanego leczenia – chemioterapii lub radioterapii – lecz zwykle nie miały z tym nic wspólnego. Na podstawie wszystkich tych obserwacji sformułowaliśmy koncepcję, że genetyczna podatność na nowotwory może spowodować wystąpienie kilku różnych guzów u jednego pacjenta lub też różnych przypadków nowotworów w jednej rodzinie".

W tym czasie do malutkiego zespołu dołączył Fred Li, z wykształcenia również onkolog dziecięcy. „Fred był wspaniałym człowiekiem" – wspomina Fraumeni. „Był jak książę. Łatwy we współpracy, bardzo inteligentny i bardzo skromny. Bardzo wzmocnił naszą grupę". (Fraumeni ma osobliwy zwyczaj nazywania „księciem" każdej osoby, którą podziwia – w tym także Alfreda Knudsona, którego badania nad siatkówczakiem doprowadziły, jak być może pamiętacie, do odkrycia supresorów nowotworowych[38]). Historia zespołu chorobowego, którego nazwa pochodzi właśnie od nazwisk Fraumeniegio i Li, zaczęła się od analizy przypadków nowotworów kory nadnerczy, które

atakują zewnętrzną warstwę tkanki nadnerczy. Nadnercza to niewielkie gruczoły położone na górnym biegunie nerki, które wytwarzają hormony kontrolujące wiele istotnych funkcji życiowych, takich jak akcja serca, ciśnienie krwi, reakcja na stres, tempo rozwoju oraz popęd płciowy. „Nowotwory kory nadnerczy są bardzo, bardzo rzadkie, więc musieliśmy odwiedzić 10 szpitali, żeby zebrać dane o 21 przypadkach. U dwóch pacjentów pojawił się także rak mózgu... Naprawdę niezwykła sytuacja!" – mówi Fraumeni. Przerywa na moment dla wzmocnienia przekazu. „Później, kiedy już zakończyliśmy badania, dostałem informację, że również trzeci z pacjentów zachorował na raka mózgu, a w jego rodzinie występują przypadki mięsaków. Wyglądało to na działanie jakiegoś silnego wroga... Trzy takie przypadki to sytuacja co najmniej niezwykła. Tak więc, pojawiło się sporo przesłanek świadczących o tym, że coś jest na rzeczy".

Moment olśnienia przyszedł, gdy Fred Li dowiedział się o rodzinie, w której dwóch kuzynów zachorowało na mięsaka komórek prążkowanych (nowotwór mięśni, który zaatakował również małego Johna Berkeleya, bohatera historii przedstawionej na początku rozdziału). U matki jednego z nich w wieku dwudziestu kilku lat zdiagnozowano raka piersi, ojciec zaś drugiego chorował na ostrą białaczkę. „To było zupełnie nieprawdopodobne, tyle przypadków raka w tym samym czasie" – komentuje Fraumeni. Obaj lekarze skupili się na tej rodzinie, analizując choroby, które występowały w niej od pokoleń i odkryli niespotykane nagromadzenie nowotworów, czasem po kilka u jednej osoby. „To było to – wiedzieliśmy, że to musi być jakiś zespół chorobowy".

Zainspirowani tym przykładem obaj naukowcy-detektywi postanowili raz jeszcze przejrzeć wszystkie badane wcześniej

przypadki nowotworów dziecięcych, poszukując młodych pacjentów, u których wystąpił ten sam typ mięsaka. Przyglądając się im dokładniej, znaleźli kolejne trzy rodziny, w których nowotwór u dzieci wiązał się z występowaniem nowotworów u ich, wciąż jeszcze młodych, rodziców. Przekonani, że odkryli coś ważnego, co mogłoby pomóc w wyjaśnieniu, dlaczego u dzieci pojawia się śmiertelna choroba, kojarzona zazwyczaj ze spustoszeniem organizmu w późnym wieku lub z długotrwałym narażeniem na działanie szkodliwych czynników, natychmiast zabrali się za pisanie artykułu dla „Annals of Internal Medicine". „Najwięcej czasu zajęło nam podjęcie decyzji, jak nazwać ten zespół chorobowy" – uśmiecha się Fraumeni. „Fred podchodził do tego bardziej zachowawczo ode mnie, więc skończyło się na «rodzinnym nowotworze» ze znakiem zapytania".

Działo się to w roku 1969, a więc jeszcze zanim naukowcom udało się jednoznacznie potwierdzić genetyczne podstawy nowotworów, a większość mew spoglądała w stronę wirusów. Artykuł Li i Fraumeniego, sugerujący istnienie zespołu chorobowego obejmującego całe rodziny – co jednoznacznie wskazywało uwarunkowania genetyczne – został więc przyjęty z jawnym sceptycyzmem. W środowisku znane były co prawda nieliczne przykłady nowotworów dotykających całe rodziny, a zatem z pewnością dziedziczonych, ale były to zazwyczaj przypadki tych samych typów choroby występujących w kolejnych pokoleniach – najczęściej nowotwory piersi, jelita lub jajników – które zawsze atakowały dorosłych. „Odkryty przez nas syndrom był niezwykły w tym sensie, że osobami atakowanymi przez chorobę były dzieci i młodzież. A przy tym były to bardzo różne rodzaje nowotworów... począwszy od białaczki przez glejaki, mięsaki, raka nadnerczy

aż po nowotwory piersi. Pojawiały się wśród nich również inne dziwne nowotwory, takie jak rak splotu naczyniówkowego pojawiający się w nabłonku mózgu otoczonym przez płyn mózgowo-rdzeniowy. Nowotwory te występują w LFS tak często, że można by je uznać za objawy patognomoniczne (tzn. charakterystyczne dla tego zespołu chorobowego). To tak jak rak kory nadnerczy u dzieci – widzisz go i od razu wiesz, że oznacza LFS".

Właśnie ta ogromna różnorodność typów nowotworów zastanawiała sceptyków. Niektórzy sugerowali, że za rodzinnym wzorcem kryje się wirus przekazywany dziecku przez matkę podczas ciąży i w trakcie narodzin – tak jak HIV. Inni twierdzili, że w ogóle nie ma żadnego ogólnego wzorca, a to, co obserwują, to „czysty przypadek". Jednak Li i Fraumeni, chociaż jako dobrzy naukowcy powinni zachować otwarty umysł, byli całkowicie przekonani, że przyczyną badanych przez nich przypadków rodzinnego występowania nowotworów są właśnie uwarunkowania genetyczne. Postanowili kontynuować obserwację czterech rodzin, których historie stały się podstawą ich hipotezy. Okazało się, że w ciągu kolejnych 12 lat pojawiło się w nich 16 nowych przypadków nowotworów, a wszystkie należały do grupy charakterystycznej dla odkrytego przez nich zespołu.

W tamtym okresie w dziedzinie epidemiologii nowotworów rodzinnych pojawiły się dwie nowe ekipy. Pierwszą z nich był zespół działający w MD Anderson w Houston, a na jego czele stała Lousie Strong. Drugą, powstałą na Uniwersytecie Manchester, kierowała Jill Birch. Wspólnie ekipy te dostarczyły wiele nowych dowodów potwierdzających hipotezę Li i Fraumeniego, a także przypadkowo przyczyniły się do tego,

że nazwa „zespół Li-Fraumeni” lub LFS wkradła się niepostrzeżenie do literatury i powszechnego użycia w latach osiemdziesiątych. Potrzebna była jednak jeszcze dekada, by naukowcy odkryli, że genem odpowiedzialnym za tragedie tych rodzin był zmutowany p53.

IDENTYFIKACJA ODPOWIEDZIALNEGO GENU

Pod koniec lat 80. do zespołu Freda Li, który był wówczas praktykującym onkologiem i jednocześnie kierował Wydziałem Epidemiologii Nowotworów w Dana-Farber Institute w Bostonie, dołączył David Malkin. Ten młody kanadyjski pediatra, świeżo po stażu odbytym w Sick Kids Hospital w Toronto, chciał poszerzyć swoje zdobyte w zakresie nowotworów dziecięcych doświadczenie, by móc je później wykorzystać w pracy po powrocie do Kanady. Jednak czas, który Malkin spędził w towarzystwie Li – opisuje go jako „dżentelmena i badacza nienarzucającego się, ale zawsze obecnego, o ogromnej, niezwykłej wiedzy” – obudził w nim zainteresowanie badaniami. W efekcie młody Kanadyjczyk postanowił, że oprócz praktyki lekarskiej będzie również rozwijał karierę naukową. Został asystentem Steve’a Frienda, tego samego, który zaledwie trzy lata wcześniej odkrył pierwszy supresor nowotworowy – Rb. Friend właśnie opuścił laboratorium Weinberga, by otworzyć własne na Harvardzie. Pewnego razu, podczas wspólnego posiłku, Malkin i Friend zastanawiali się nad nowym projektem badawczym, który mogliby razem prowadzić. „Steve powiedział, że dobrze mu się pracowało z Fredem (Li) i że razem badali uwarunkowania genetyczne tego dziwnego nowego zespołu chorobowego. Ja sam

bardzo niewiele wiedziałem wtedy na temat LFS, ale brzmiało to bardzo intrygująco" – opowiada Malkin.

Biorąc pod uwagę ogromny zakres planowanych badań i brak jakichkolwiek wskazówek, naukowcy postanowili na początek przyjrzeć się genowi Rb – choćby dlatego, że w przypadku chorób dziedzicznych nieprawidłowo funkcjonujący supresor nowotworowy, który pozostawiałby nosicieli bez skutecznej ochrony, wydawał się najbardziej oczywistym kandydatem. Poza tym Friend bardzo dobrze znał gen Rb, a żaden z badaczy nie miał powodów, by wybrać p53, który w tamtym okresie wciąż jeszcze uznawany był za jeden z onkogenów. Zupełnie przypadkowo analizy Rb zakończyły się fiaskiem mniej więcej w tym samym okresie, kiedy p53 zaczynał ujawniać swoje prawdziwe oblicze. W 1989 roku Suzy Baker i Bert Vogelstein ujawnili, że typ dziki genu p53 jest w rzeczywistości supresorem nowotworowym, a nieco później w tym samym roku naukowcy z Toronto, prowadzący doświadczenia na modelach myszy, opublikowali artykuł opisujący liczne typy nowotworów, które rozwinęły się u zwierząt ze zmutowanym p53. Jak zauważył Malkin, nowotwory występujące u myszy nie do końca odpowiadały tym, na które chorowali członkowie rodzin dotkniętych LFS, ale był to na tyle wyraźny pokaz działania p53, że obaj badacze postanowili skierować swoją uwagę na ten nowoodkryty gen supresorowy.

Badając materiał uzyskany od członków rodzin dotkniętych LFS, którzy byli pacjentami poradni onkologicznych Freda Li i Louise Strong, Friend i Malkin przystąpili do wyizolowania genu p53, by wyszukać w nim potencjalne mutacje. W tamtym okresie był to niezwykle żmudny i pracochłonny proces klonowania oraz sekwencjonowania fragmentów DNA, jednego

po drugim, aż do czasu znalezienia poszukiwanego genu. „Wiele sekwencji nie zadziałało i dopiero po ponad roku prób udało nam się uzyskać pierwsze trafienie" – opowiada Malkin. „Pamiętam, jak spojrzałem na żel, porównałem sekwencjonowany gen z normalnym p53 i zauważyłem mutację. Mieliśmy dużo szczęścia, bo pojawiła się na kodonie 248, czyli tam, gdzie występuje najczęściej. Był to naprawdę szczęśliwy traf, ponieważ gdyby mutacja wystąpiła w jakimś mniej oczywistym miejscu, być może nie zwrócilibyśmy na nią uwagi".

Naukowcy wiedzieli, że czeka ich jeszcze wiele miesięcy ciężkiej pracy, niezbędnej, by potwierdzić odkrycie i znaleźć kolejne mutacje. Kiedy jednak zdali sobie sprawę, że są na właściwym tropie, wszyscy w laboratorium poczuli wiatr w żaglach. „To taki okres, w którym wyłączasz budzik i siedzisz w laboratorium przez cały czas, bo naprawdę świetnie się bawisz!" – mówi Malkin z uśmiechem. „Lato 1990 roku było bardzo ekscytujące. Byliśmy w nowiutkim budynku, z pięknym widokiem na zatokę... Nie było żadnych powodów, żeby rezygnować z tej zabawy, więc laboratorium było stale na chodzie".

Po ułożeniu pełnego obrazu, pokazującego, jak przebiegają mutacje u osób z zespołem Li-Fraumeni, Malkin i Friend przygotowali artykuł dla „Science", pracując nad nim głównie w pobliskiej pizzerii, przy stole pokrytym zapisanymi kartkami, pośród talerzy z resztkami jedzenia, nie zwracając uwagi na to, co się wokół nich dzieje. Wiedzieli, że wywołają zamieszanie. Choć LFS jest niezwykle rzadkim schorzeniem, to odkrycie, że mutacja p53 jest pierwotną przyczyną problemu i może wywoływać tak różnorodne typy raka, potwierdziło ogromne znaczenie tego genu w procesie powstawania nowotworów u ludzi. I to nie na podstawie doświadczeń laboratoryjnych

na sztucznie wyhodowanych kulturach lub myszach, ale na podstawie analizy prawdziwych przypadków. Dawało to również możliwość zidentyfikowania osób i rodzin bardziej zagrożonych nowotworami, by następnie, dzięki dokładnym badaniom kontrolnym, wykrywać i leczyć u nich łagodne zmiany, zanim rozwinie się z nich złośliwy nowotwór.

W ciągu kolejnych lat donoszono o różnych mutacjach genu p53 występujących u ludzi z LFS, na przykład takich, które nie są przekazywane przez rodzica, a pojawiają się w ciągu życia. Najczęściej pojawiają się takie mutacje, które oddziałują na zdolność p53 do wiązania się z DNA w celu aktywowania innych genów (czyli działania w roli czynnika transkrypcyjnego). Badacze odkryli również, że u dziewczynek urodzonych z LFS ryzyko wystąpienia nowotworów w którymś momencie życia wynosi ponad 90 proc., u chłopców zaś około 75 proc., przy czym u kobiet zwiększone ryzyko wiąże się najprawdopodobniej z możliwością wystąpienia raka piersi. Większość onkologów rozpoznaje wzorce typowe dla LFS. Fraumeni zwraca jednak uwagę: „Obserwując te rodziny zauważyłem, że podatność na nowotwory nie ogranicza się do tak zwanych klasycznych odmian raka – mózgu, nadnerczy, piersi czy mięsaków. Nowotwór może się pojawić w każdym miejscu, ryzyko jest zwiększone w każdej tkance".

ŻYJĄC Z LFS – CIĄG DALSZY HISTORII LUANY LOCKE

Tak wyglądały szanse Luany Locke, kiedy dowiedziała się, że jej rodzina została dotknięta zespołem Li-Fraumeni, co wyjaśniało przynajmniej, dlaczego w jej przypadku piorun uderzał ciągle

w to samo miejsce. Kiedy matka, siostra i ciotka Luany zmarły na raka na początku lat 70., LFS znane było tylko wąskiej grupie badaczy i lekarzy, a choroba nawet nie miała jeszcze swojej nazwy. Dopiero kiedy u córki jej ciotki Rity, mieszkającej we Włoszech Jessiki Zendri, rozwinął się nowotwór obu piersi oraz nowotwór kory nadnerczy, pewien genetyk z Mediolanu odkrył u niej germinalną mutację p53. Zasugerował, że Luana powinna przejść podobne badania w Kanadzie i polecił jej wizytę u najbardziej znanego specjalisty w tej dziedzinie, Davida Malkina, który w owym czasie pracował znów w Sick Kids Hospital w Toronto.

Po tym, co przeżyła, Luana nie była wcale zaskoczona pozytywnym wynikiem testu. Wówczas jednak, nieoczekiwanie, zupełnie przestała się martwić o siebie. „Pamiętałam tylko, że usłyszałam: «Ryzyko, że przekazała to pani swojemu dziecku, wynosi 50 procent». Teraz chodziło tylko o mojego syna – czy odziedziczył po mnie mutację? Dlatego postanowiłam zrobić mu badanie. Potrzebowałam tej wiedzy, po prostu musiałam wiedzieć".

Po wizytach Luany i jej męża w poradni genetycznej oraz ponownej konsultacji z Malkinem, szczegółowo opowiedziano im o konsekwencjach związanych z diagnozą kobiety i wyjaśniono prawdopodobieństwo nosicielstwa zmutowanego genu u ich czteroletniego syna Lucasa. „Wszyscy, z którymi rozmawialiśmy, byli odpowiednio przygotowani" – wspomina Luana. „Każdy mówił: «Musicie państwo rozważyć wiele kwestii, możliwość fałszywego pozytywnego wyniku i fałszywego negatywnego wyniku, fakt, że podejmujecie tę decyzję w imieniu syna oraz to, kiedy mu powiecie, jaki jest wynik. Co, jeśli on sam nie chciałby wiedzieć i będąc dorosłym nie zdecydowałby się na badanie?».

Mówili mi to wszystko, ale ja już nie słuchałam. Siedziałam tam i odpowiadałam: «Dobrze, jasne, oczywiście, muszę się nad tym zastanowić». Ale przez cały czas słyszałam tylko wewnętrzny głos, powtarzający: *Muszę mu zrobić testy. Muszę wiedzieć*".

Co myślał Paul, jej mąż? „Muszę przyznać, że nie dałam mu wyboru, wykorzystałam to, że jestem matką, taka już jestem. Nie pozwolę na to, żeby ktoś ukrywał przede mną coś ważnego. Chyba bym tego nie przeżyła. Poza tym jestem wieczną optymistką. Myślałam: Co? On na pewno nie ma tej mutacji! Po prostu pokażcie mi ten wynik, żebyśmy załatwili to raz na zawsze i mieli to z głowy!".

Po okresie przeznaczonym na zastanowienie się, Locke'owie przywieźli Lucasa na badanie. Patrzyłam, jak siedząc ze mną przy stoliku w kawiarni dwanaście lat później, Luana przypomina sobie tamten dzień w klinice. „Przyszła do nas lekarka z poradni genetycznej współpracująca z doktorem Malkinem, trzymając w ręce dużą żółtą kopertę. Poprosiła, żebyśmy usiedli, my i Lucas, i zaczęła swój wykład. Mówiła o genie, o jednej nici, o drugiej nici, a ja spokojnie słuchałam. Myślałam sobie: *No dobra, trochę przeci*ąga*, ale na pewno zaraz powie*: «...ale tutaj nic nie ma... czysta karta!». Dlatego, kiedy usłyszałam: «No i znaleźliśmy...»..., pomyślałam: *Przepraszam, co?* Nie, nie powiedziałam tego głośno, ale pamiętam, że myślałam wtedy: *Zaraz, chwila, nie jestem na to przygotowana. Ta historia miała się inaczej zakończyć*" – szczęka Locke opada, kiedy odtwarza tamten moment szoku.

„Tamta lekarka musiała zapewne pomyśleć: *Kiedy ta kobieta wreszcie zrozumie, do czego zmierzam? Przecież ona się cały czas uśmiecha...*". Dopiero wtedy Luanie i Paulowi zaczęły przypominać się wszystkie pytania, nad którymi mieli się

wcześniej zastanowić. „Wracały do mnie po kolei. *Co, jeśli on wcale nie będzie chciał wiedzieć? Jak mam utrzymać tę informację w tajemnicy? Czy będę go traktować inaczej? Oczywiście, że tak...* Oboje pomyśleliśmy, że musimy go chronić". Tamtego wieczoru wzięli Lucasa do swojego łóżka – czego nigdy wcześniej nie robili – i oboje przytulili go bardzo mocno.

Z biegiem czasu rodzina Locke'ów nauczyła się żyć z LFS. Przyzwyczaili się do regularnych odwiedzin w szpitalu Sick Kids, gdzie Lucas co trzy miesiące przechodził badania kontrolne, a po jakimś czasie zdecydowali się na drugie dziecko. Pamiętając o tragediach w rodzinie żony, Paul postawił warunek, że jeśli Luana zajdzie w ciążę, zrobią badanie płodu i rozważą usunięcie go, gdy okaże się, że to dziecko także jest nosicielem zmutowanego genu. Ale, jak mówi Luana, tak naprawdę aborcja nigdy nie wchodziła w grę. Kiedy zaszła w ciążę i zaczęła zastanawiać się nad badaniem, zdała sobie sprawę, że nie da rady go przeprowadzić. Przez cały czas prześladowało ją pytanie, czy gdyby taka możliwość istniała 47 lat wcześniej, czyli w czasach, gdy to jej matka zakładała, to zdecydowałaby się na aborcję Luany i jej rodzeństwa?

Siostra Lucasa, Juliet, przyszła na świat w 2006 roku. Tym razem Luana również wierzyła, że wszystko będzie w porządku. „W końcu, jak się ma dwoje dzieci, to ryzyko wynosi 50/50... a raz już poszło źle" – mówiła. Niestety, jej optymizm po raz kolejny okazał się nieuzasadniony. Wraz z Paulem usłyszeli, że Juliet również jest nosicielką zmutowanego genu i że będą musieli pomóc swojej córce, tak jak pomagają synowi, nauczyć się żyć w cieniu raka.

Jak odkrył John Berkeley, życie z zespołem Li-Fraumeni może prowadzić do samotności. Do niedawna, schorzenie to uznawane

było za nadzwyczaj rzadkie. Do 2011 roku w literaturze na całym świecie opisano zaledwie 500 rodzin, u których wystąpiła germinalna mutacja genu p53. Jednak było to zanim dr Maria Isabel Achatz odkryła, co się dzieje w południowej Brazylii.

ROZDZIAŁ 17

Wątek handlarzy *tropeiro*

...z którego dowiadujemy się o rodzinach z zespołem Li-Fraumeni, u których występuje nietypowa mutacja genu p53 wywodząca się prawdopodobnie od brazylijskiego osadnika z połowy XIX wieku.

* * *

Niczego w życiu nie należy się bać, należy to tylko zrozumieć.

Maria Skłodowska-Curie[39]

Sao Paulo to miasto moloch, w którym można spotkać zarówno niewyobrażalne bogactwo, jak i skrajne ubóstwo. Nędzne drewniane budy tłoczą się w cieniu drapaczy chmur ze stali i szkła, a tu i ówdzie biedacy kulą się w bramach wzdłuż ulic, którymi ich współobywatele w markowych ubraniach pędzą do pracy, na zakupy lub na spotkania ze znajomymi. Wszędzie ogromne tropikalne drzewa, jakby w upartym sprzeciwie wobec wszechobecnego betonu i asfaltu, odkształcają korzeniami chodniki, obsypują kwiatami przechodniów i zapewniają schronienie chmarom świergoczących ptaków. W tym właśnie mieście mieszka Maria Isabel Achatz i tam, pracując w wielkim, nowoczesnym szpitalu [onkologicznym] A.C. Camargo, zaczęła odkrywać niezwykłą historię występującego rodzinnie

nowotworu. Tam też odwiedzam ją późnym latem 2012 roku, by wysłuchać tej opowieści.

A.C. Camargo, największy szpital onkologiczny w Ameryce Południowej, został zbudowany w 1953 roku na miejscu dawnej japońskiej świątyni, niedaleko centrum miasta i jego zatłoczonych bulwarów. Dzielnicę, w której stoi szpital, Liberdade, tworzy sieć wąskich, zaniedbanych uliczek, pełnych sklepików, punktów usługowych oraz restauracyjek i barów rozrzuconych na wzgórzach, z których rozciąga się widok na całe miasto, z jego zielonymi skwerami, starymi kościołami i ruchliwymi arteriami. W Liberdade mieszka najliczniejsza diaspora japońska. Ogromny biały budynek A.C. Caramago, otoczony kompleksem centrów badawczych i naukowych, dominuje nad całą dzielnicą. W każdym roku leczy się tutaj około 15 tys. pacjentów. 5 proc. z nich to obcokrajowcy, których do A.C. Caramago przyciągają doskonałe umiejętności i znakomita reputacja brazylijskich onkologów.

Achatz jest onkogenetykiem, specjalistką w stosunkowo młodej dziedzinie medycyny skupiającej się na przypadkach, w których wada genu jest dziedziczona, a nie pojawia się przypadkowo w okresie życia chorego. Dorastała w kosmopolitycznej rodzinie w Rio de Janiero jako najmłodsza z sześciorga dzieci ekonomisty. Jej matka nie pracowała, zajmowała się domem. Po ukończeniu szkoły Achatz rozpoczęła studia w dziedzinie sztuki i projektowania w Paryżu. Jednak jej plany kariery artystycznej zmieniły się, kiedy wraz z grupą przyjaciół z uczelni wybrała się w podróż do Indii. Młodzi ludzie spędzili jakiś czas na granicy Kaszmiru, niedaleko kolonii trędowatych żyjących w odosobnieniu, w grotach na stokach wzgórz. Ich ciężka dola i niezwykła zaradność wywarły na młodej Achatz ogromne

wrażenie. Ale dopiero jej przypadkowe spotkanie z Matką Teresą, której zakon prowadził tę kolonię, sprawiło, że postanowiła zostać lekarzem. „To było niesamowite spotkanie, w wyniku którego pomyślałam, że muszę zacząć robić coś wartościowego".

Achatz wróciła do Brazylii i rozpoczęła w Sao Paulo studia medyczne – przerywane na krótko narodzinami jej dwojga dzieci. Rodzina była dla niej zawsze bardzo ważna. „Zdecydowałam, że zostanę genetykiem, ponieważ będę mogła pracować z rodzinami. Najbardziej chciałam zajmować się genetyką nowotworów, nauką, która dopiero się rodziła" – mówi. A.C. Camargo prowadzi jeden z największych programów onkogenetyki na świecie i już w ciągu pierwszego roku pracy w szpitalu, jeszcze podczas stażu, Achatz spotkała 30 rodzin obciążonych, jak jej się zdawało, zespołem Li-Fraumeni.

„Wydało mi się to niezwykłe, ponieważ LFS uznawany był za bardzo rzadki zespół chorobowy. W tamtym okresie w literaturze opisano zaledwie 280 przypadków rodzin dotkniętych tym zespołem, a ja widziałam już 30. Pomyślałam wtedy, że albo mylę się w diagnozowaniu, albo to naprawdę jakaś wyjątkowa sytuacja" – opowiadała mi Achatz podczas naszej rozmowy w jej małym, pozbawionym okien gabinecie przylegającym do laboratorium w jednym z centrów badawczych. Maria Isabel to pełna niewymuszonej elegancji, wysoka i szczupła kobieta z długimi, ciemnymi włosami, które czasami nosi związane w kucyk. Ubrana zwyczajnie, w białą koszulę i spodnie, siedzi za biurkiem w pełnej gotowości do odebrania telefonu od któregoś ze swoich pacjentów, kolegów lub studentów.

Opowiada mi, że istnieje około 70 zespołów predyspozycji nowotworowych, ale ona sama ma szczególne oko

do wychwytywania LFS – od czasu, kiedy spotkała pierwszą rodzinę dotkniętą tym zespołem jeszcze podczas studiów medycznych w Sao Paulo. „Tamta pacjentka przyszła tylko na badanie kontrolne, jednak pod koniec wizyty powiedziała: «Tak naprawdę, to czuję się jak weteran. Miałam już pięć różnych nowotworów». Zapytałam: «Chodzi pani o przerzuty?». Odparła: «Nie, nie, pięć różnych rodzajów raka». A potem wymieniła wszystkie, które przeszła i dodała: «To dość częste w naszej rodzinie, co chwilę ktoś choruje na raka... To się po prostu zdarza, a potem zdrowiejemy»".

„Zafascynowało mnie to do tego stopnia, że zaczęłam bardzo uważnie studiować ów syndrom. A kiedy wróciłam do szpitala na staż, moim pierwszym pacjentem był chory z zespołem Li-Fraumeni. Potem pojawiało się ich coraz więcej, i tak pod koniec pierwszego roku miałam już 30 przypadków rodzin z LFS".

Jednym ze sposobów wykorzystywanych przez naukowców do upowszechniania informacji na temat swoich odkryć są specjalne plakaty, zawierające opisy projektów badawczych. Plakaty te zawieszane są na specjalnych tablicach informacyjnych, umieszczanych w bocznych pokojach podczas konferencji naukowych. Dzięki temu w trakcie przerw uczestnicy konferencji mogą się zapoznać z wynikami badań swoich kolegów. Szef Achatz ze szpitala A.C. Camargo przekonał ją, by wysłała projekt takiego plakatu z informacjami na temat rodzin z LFS na konferencję onkologiczną w Paryżu, planowaną na zimę 2002 roku. Kiedy projekt został przyjęty, oboje postanowili wziąć udział w tej konferencji. Achatz wspomina, jak w pewnym momencie znalazła się przed swoim plakatem, omawiając swoje obserwacje z wysokim i poważnym naukowcem w okularach, którego nazwiska nie znała, gdy jeden z organizatorów

zdenerwowany podszedł do nich i powiedział mężczyźnie, że za chwilę powinien być na scenie, ponieważ przewodniczy kolejnej sesji. Odchodząc w pośpiechu, naukowiec, Pierre Hainaut, zostawił jej swoją wizytówkę. „I wtedy zdałam sobie sprawę, że rozmawiałam z jednym z najważniejszych ludzi z centrum badawczego Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem przy Światowej Organizacji Zdrowia (IARC)" – zakończyła ze śmiechem.

Jako człowiek prowadzący bazę danych mutacji p53, Hainaut dobrze znał LFS, ale był również świadomy faktu, że to bardzo rzadki zespół chorobowy. Dlatego tak zafascynowała go opowieść Achatz. Zaprosił ją, by przed powrotem do domu odwiedziła go w laboratorium w Lyonie i tam, po długiej rozmowie, uzgodnili, że będą wspólnie dalej badać brazylijski fenomen. Maria Isabel nigdy wcześniej nie wyobrażała sobie siebie w roli naukowca lub badaczki. „Bardzo dobrze się czułam jako lekarz, zajmując się pacjentami i starając się jak najwcześniej wykryć u nich zmiany nowotworowe" – mówi. Poza tym podczas konferencji w Paryżu była w czwartej ciąży i chciała jak najszybciej powrócić do starannie zaplanowanego życia rodzinnego i pracy w szpitalu, którą na chwilę zostawiła. Jednakże, zachęcana przez Hainauta, zrobiła doktorat i dziś łączy pracę badawczą i opiekę nad grupą studentów z intensywną praktyką lekarską w szpitalu A.C. Camargo.

Jak mówi Achatz, onkogenetyka to wyjątkowo wymagająca specjalizacja, „ponieważ przynoszę moim pacjentom złe wiadomości, mówiąc, że członkowie ich rodzin będą musieli już zawsze szczególnie na siebie uważać. Nie wykonuję zabiegów i nie leczę ludzi. Podaję im tylko pomocną dłoń i proponuję

wsparcie po drodze, ale wiem, że nigdy nie będę w stanie ulżyć ich cierpieniu".

Opowiada historię trojga rodzeństwa, dorosłych, ale jeszcze młodych ludzi, kobiety i dwóch mężczyzn, którzy postanowili przystąpić do programu, obserwując wieloletnie zmagania matki z licznymi atakami nowotworów. Po konsultacji z całą trójką i upewnieniu się, że rozumieją implikacje tej sytuacji, Achatz pobrała od nich krew i wysłała próbki do analizy. Była w szoku, kiedy w kolejnym tygodniu dowiedziała się od ich matki, że jeden z jej synów, wykształcony inżynier z doktoratem i dobrą pracą, po wyjściu z kliniki, nie czekając na wynik badań, rzucił pracę, zostawił żonę i dwoje dzieci i zdecydował się na wazektomię. Jak powiedział, chciał żyć pełnią życia, dopóki miał szansę.

„Kiedy, niedługo później, otrzymałam jego wyniki, okazało się, że nawet nie jest nosicielem zmutowanego genu" – mówi Achatz, kręcąc głową na wspomnienie niepotrzebnego dramatu. „Dobrze wykształcony człowiek... Poświęciłam mnóstwo czasu, żeby mu wszystko wyjaśnić. Przecież wszystko świetnie zrozumiał. Oto, co może zrobić z człowiekiem obawa przed chorobą genetyczną – wykształcenie, iloraz inteligencji czy wychowanie nie mają żadnego wpływu na reakcję. Sama świadomość jest takim ciosem, że nikt nie może przewidzieć, co zrobimy".

Po pierwszym spotkaniu w Lyonie w 2002 roku Hainaut poprosił Achatz, by pobierała próbki krwi od swoich pacjentów w Sao Paulo i wysyłała je do IARC do analizy. Po wyekstrahowaniu DNA naukowcy rozpoczęli izolowanie i sekwencjonowanie tych fragmentów genu p53, w których dochodzi do większości ważnych mutacji – również tych, które pojawiają się w przypadku LFS. Jednak spośród 45 pacjentów

podejrzewanych o LFS, tylko u trzech badacze zidentyfikowali mutacje. Achatz poczuła się upokorzona. „Powiedziałam: «No cóż, jednak się myliłam, to były błędne diagnozy. Nie mamy tu w Brazylii nic nadzwyczajnego»". Ale Hainaut nie poddał się tak łatwo. Zdecydował, że trzeba na nowo sekwencjonować cały gen, także fragmenty znajdujące się poza tradycyjnymi punktami zapalnymi na obu końcach genu. Tym razem odkryto, że bardzo duży odsetek chorych osób jest nosicielami zmutowanego genu p53 – jednak mutacja najczęściej pojawiała się u nich na kodonie 337.

Kodon 337 znajduje się w części genu odpowiadającej za sposób zwijania białka, który z kolei wpływa na jego interakcje z innymi białkami w komórce. Hainaut wiedział, że taką samą niezwykłą mutację odkryto niewiele wcześniej, bo w 2001 roku, w związku z nowotworami kory nadnerczy (*adrenocortical cancer*, ACC) – co ciekawe, również w Brazylii. Jak zapewne pamiętacie, ACC to rzadki nowotwór dziecięcy, badany przez Li i Fraumeniego podczas poszukiwania dowodów na istnienie zespołu chorobowego powodującego zwiększoną skłonność rodzin do zapadania na nowotwory. Jednak brazylijscy naukowcy, kierowani przez Raula Ribeiro, uznali, że nie ma żadnych dowodów na to, by mutacja na kodonie 337 oznaczała skłonność do zapadania na jakikolwiek inny nowotwór niż ACC u dzieci. Twierdzili, że nie jest ona elementem jakiegoś szerszego zespołu wywołującego raka i w swoim artykule dla „PNAS" przedstawili przekonujące uzasadnienie swojej hipotezy. Dowodzili mianowicie, że mutacja na kodonie 337 jest charakterystyczna tylko dla jednego typu nowotworu, ponieważ jest to tak zwana mutacja warunkowa, co oznacza, że powoduje niewłaściwe zwinięcie białka tylko przy określonym poziomie pH (skala

kwasowości w komórce) w komórkach nadnerczy. Ponadto sugerowali, że przyczyną występującej w plemnikach lub komórkach jajowych mutacji przekazywanej następnym pokoleniom, może być wysoki poziom pestycydów powszechnie stosowanych w rolnictwie w południowej Brazylii.

„Takie przypuszczenia pojawiały się już wcześniej i podczas mojego pierwszego spotkania z Marią Isabel omawialiśmy kwestię pestycydów" – wspomina Hainaut. Pragnąc zweryfikować koncepcję Ribeiro i jego zespołu, i bliżej przyjrzeć się związkowi mutacji na kodonie 337 z występowaniem innych typów nowotworów, Hainaut poleciał w 2005 roku do Sao Paulo, by kontynuować badania wspólnie z Achatz. Ona sama nieco wcześniej podjęła współpracę z Patricią Prollą, kierującą poradnią genetyki w wielkim Szpitalu Klinicznym w Porto Alegre na południu kraju, do której również często zgłaszali się pacjenci z podejrzeniem LFS. Cała trójka naukowców udała się do Ibiuny, małego miasteczka na obrzeżach Sao Paulo, gdzie jedna z najbardziej otwartych pacjentek Achatz obiecała zorganizować spotkanie rodzinne w swoim domu. Czekało tam na nich 26 osób, które nad kawą i ciastem opowiadały swoje historie przez całe popołudnie.

„Widzieli tyle śmierci w swojej rodzinie i nikt nigdy nie powiedział im, że można coś z tym zrobić. Dlatego wszyscy myśleli: «No cóż, taka po prostu jest nasza rodzina»" – wspomina Achatz. „Wielu z nich mówiło, że to może być jakaś klątwa". Jednak przekazane przez trójkę naukowców informacje o LFS i badaniach kontrolnych, pozwalających wykryć nosicieli niebezpiecznej mutacji genu, rozniecily płomyk nadziei wśród zgromadzonych na spotkaniu przedstawicieli trzech pokoleń feralnej rodziny i nieco rozwiały ich obawy. Achatz, Prolla

i Hainaut opuścili dom z próbkami krwi pobranymi od niemal wszystkich uczestników spotkania.

Grupa ta stanowiła tylko niewielką część ogromnej rodziny mieszkającej w pobliżu Ibiuny. Jednak informacje o spotkaniu z zespołem z A.C. Camargo szybko rozeszły się wśród pozostałych jej członków. Wielu spośród tych, którzy wcześniej nie czuli się na siłach, by dzielić się z obcymi swoimi bolesnymi historiami, zdecydowało, że chce się dowiedzieć, dlaczego są tak podatni na nowotwory i czy można temu w jakiś sposób zaradzić. Kilka tygodni później, 85 członków rodziny przybyło do Sao Paulo na spotkanie z Achatz. „To było w 2005 roku i do dziś widuję ich niemal co tydzień – zawsze jest tu ktoś z ich rodziny" – mówi Achatz. „Jeden kuzyn przyprowadza drugiego, ciągle przychodzą nowi".

GDZIE TO SIĘ ZACZĘŁO? JAK BARDZO SIĘ ROZPRZESTRZENIŁO?

Kiedy Achatz i Hainaut zrozumieli skalę problemu w rodzinie z Ibuiny, zaczęli sobie zadawać pytanie o początki i zasięg mutacji. Z pomocą miejscowego księdza, który udostępnił im księgi parafialne zawierające rejestry małżeństw, narodzin, chrztów i zgonów, naukowcy prześledzili historię rodziny do XIX wieku i narysowali drzewo genealogiczne obejmujące osiem pokoleń i kilkaset osób. Wszędzie, gdzie to było możliwe, dodawali informacje na temat nowotworów, zaznaczając, które narządy zostały zaatakowane. Ślady choroby sięgały bardzo odległych czasów, a jeden z członków rodziny zasugerował, że jej przyczyną może być spuścizna *tropeiro*.

Tropeiro byli podróżnymi handlarzami, którzy zaopatrywali we wszelkiego rodzaju towary pierwszych portugalskich osadników pracujących na farmach i w kopalniach rozsianych w południowej Brazylii. Dostarczali im też pocztę i wiadomości, zapewniając kontakt ze światem zewnętrznym. Handlarze pokonywali wielkie odległości, przebywali w drodze przez długi czas i prawdopodobnie utrzymywali kontakty seksualne z wieloma kobietami. Dlatego, podobnie jak w przypadku AIDS, ktoś, kto był nosicielem zmutowanego genu, mógł go przekazać w taki sam sposób, jak HIV został rozprzestrzeniony wzdłuż szlaków transportowych w Afryce i Azji. Taką wadę genetyczną nazywamy „mutacją założycielską". Przechodzi ona do całej populacji od jednego imigranta i na podstawie badań DNA można ją prześledzić do jednego wspólnego przodka, u którego wystąpiła po raz pierwszy. Hipoteza ta wymagała weryfikacji, ponieważ – podobnie jak w przypadku kamienia rzuconego do stawu – kręgi mutacji mogą się rozchodzić daleko i szeroko. Jak szeroko zatem mutacja na kodonie 377 rozprzestrzeniła się w Brazylii?

Okazało się, że jest bardzo rozpowszechniona. Kiedy Prolla i Hainaut przeprowadzili badania w Porto Alegre – również leżącym na szlaku *tropeiro* i ich mułów – by sprawdzić występowanie mutacji w całej populacji, uzyskali zaskakujące wyniki. Prolla, jako szczególnie zainteresowana nowotworami piersi, uczestniczyła w badaniach nowych metod profilaktyki, w ramach których przeprowadzano mammografię wśród kilku tysięcy zdrowych ochotniczek pochodzących z ubogich przedmieść Porto Alegre. Udało jej się zdobyć pozwolenie na przeprowadzenie również badań krwi u 750 kobiet. Prollo i Hainaut strzelali w ciemno – nie mieli pojęcia, czego się

spodziewać, ale znaleźli mutację kodonu 337 w dwóch próbkach. „Częstotliwość była znacznie większa niż się spodziewaliśmy" – wspomina Prolla. „Wyniki badań opublikowane w Europie i Stanach Zjednoczonych pokazywały, że germinalna mutacja genu p53 występuje w jednym na 5 tys. przypadków. Jeśli pomyślimy, że w południowo-wschodniej Brazylii jeden rodzaj mutacji pojawia się raz na 300 lub 400 przypadków, to znaczy, że występuje ona znacznie częściej – przynamniej 10 razy częściej – niż jakakolwiek inna mutacja germinalna genu p53 gdziekolwiek w świecie".

To nadzwyczaj częste występowanie mutacji potwierdziło się podczas późniejszych badań kontrolnych przeprowadzonych wśród noworodków w brazylijskim stanie Parana. Ze 171,649 dzieci, których rodzice zgodzili się na udział w badaniach, aż 0,27 proc. było nosicielami genu p53 zmutowanego na kodonie 337. Dla naukowców ten wynik był bardzo niepokojący. Zastanawiali się, czy mutacja rzeczywiście może być przyczyną nowotworów, czy też jest to fałszywy trop – w rzeczywistości niegroźny wariant genu. Jednak dowody na to, że mutacja może być niebezpieczna, były coraz mocniejsze. Oprócz tego, że zagrożenie ACC u nosicieli mutacji jest 10–15 razy większe niż „normalnie, „okazało się, że kobiety, u których występuje ta mutacja, zapadają na nowotwory piersi 10 lat wcześniej niż te, u których ona nie występuje.

Hipoteza o „wspólnym przodku" potwierdziła się, kiedy naukowcy odkryli, że wszyscy członkowie rodzin dotkniętych LFS, u których stwierdzono istnienie mutacji na kodonie 337, mieli identyczną wersję genu p53 – nie było żadnych wariancji sugerujących, że ta sama mutacja mogłaby wystąpić niezależnie i spontanicznie wiele razy. Ta zasada dotyczy także niedawno

zidentyfikowanych przypadków. Według Hainauta ów brak wariancji wskazuje również, że pierwszy przypadek pojawił się stosunkowo niedawno. „Nie mamy tu do czynienia z «efektem założyciela», który wystąpił bardzo dawno, jakieś tysiąc lat temu, ponieważ wówczas zauważylibyśmy jakąś zmianę w niekodującej części genu".

Historia badań Prolli i Hainauta w Porto Alegre ma swój epilog. Po zakończeniu badań Prolla zaprosiła obie kobiety, u których wynik był pozytywny, by zapytać je o historię chorób w ich rodzinach. Obie przyznały, że nowotwory pojawiały się w nich bardzo często. I, ku zaskoczeniu wszystkich, podczas tworzenia drzew genealogicznych, które pozwoliłyby prześledzić występowanie chorób w kolejnych pokoleniach, okazało się, że kobiety są spokrewnione. Obie wymieniły tego samego dalekiego kuzyna, który chorował na raka.

Niedługo po konsultacjach malutka bratanica jednej z kobiet zachorowała na ACC. Dzięki wcześniejszej pracy Prolli rodzina dziecka potrafiła wcześnie zauważyć objawy i dziewczynka szybko trafiła do poradni, a guza można było stosunkowo łatwo wyleczyć. Niestety, rodzice nie chcieli się zgodzić na zabieg ze względu na swoje przekonania religijne – byli świadkami Jehowy, a religia ta zakazuje transfuzji krwi. Ku ich wielkiej uldze lekarze zdjęli z nich odpowiedzialność, występując do sądu o nakaz leczenia w celu ratowania życia dziecka, a ostatecznie okazało się, że transfuzja nie była potrzebna. Dziś dziewczynka jest zupełnie zdrowa i systematycznie odwiedza poradnię Prolli i szpital wraz z ojcem i ciotką. Wszyscy troje są nosicielami zmutowanego p53 i wszyscy muszą przechodzić regularne badania kontrolne.

SPRAWA JEST BARDZIEJ SKOMPLIKOWANA

Hipoteza o związku LFS z *tropeiro* jest bardzo atrakcyjna, a rodzina z Ibuiny rzeczywiście pochodzi od jednego przodka, przybysza z Portugalii, który zarabiał na życie jako wędrowny handlarz i na początku XIX wieku zakupił w okolicach tego miasta grunty z przeznaczeniem pod uprawę winorośli. Ostatecznie jednak nie da się udowodnić, że to właśnie on był odpowiedzialny za przekazanie mutacji i Hainaut czuł od początku, że prawdziwa historia jest prawdopodobnie znacznie bardziej skomplikowana. Ma on inną teorię na temat mutacji założycielskiej, jego zdaniem równie wiarygodną. By ją zweryfikować, przez niemal dwa lata badał alternatywne możliwości, często, jeśli było to możliwe, z pomocą Achatz. Mutacja jest najbardziej rozpowszechniona w południowych stanach Brazylii, a badania zaprowadziły dwoje naukowców do miast i osad leżących wzdłuż dawnych szlaków handlowych między Sao Paulo i Porto Alegre, w odległości 860 km od największego brazylijskiego miasta, w stanie Rio Grande do Sul.

Jak tłumaczył Hainaut, kodon 337 jest fragmentem genu bardzo narażonym na mutacje. Chcąc zidentyfikować możliwe karcynogeny, on i Achatz podróżowali do ponurych miast przemysłowych, których mieszkańcy narażeni są na działanie ciężkich metali, siarki oraz innych związków chemicznych zanieczyszczających składowiska odpadów kopalnianych. Nie znaleźli tam jednak nic ciekawego. Byli także w nadmorskim mieście, niegdyś popularnym porcie, do którego w poprzednich wiekach przybywali europejscy imigranci i który chętnie

odwiedzali marynarze z całego świata, ale ich amatorskie śledztwo również nie przyniosło żadnych rezultatów.

Badając trzecią koncepcję, udali się do miasta Araranguá, leżącego 210 km na północ od Porto Alegre, w miejscu, w którym pierwsi portugalscy osadnicy pojawili się już na początku XVIII wieku. Naukowcy przez wiele godzin ślęczeli nad starymi archiwami w miejscowym ratuszu i tutaj po raz pierwszy poczuli, że mogą coś znaleźć. Rejestry wskazywały, że szlaki *tropeiro* zaczynały się w Lagunie, innym niewielkim mieście jakieś 100 km na północ. Wiodły one drogami zbudowanymi na rozkaz portugalskiego króla Jana V w ramach jego strategii zabezpieczania i zasiedlenia terytoriów pomiędzy wybrzeżem a centralnym płaskowyżem. W tamtym okresie obszary te zamieszkiwały indiańskie plemiona, nękane od czasu do czasu przez wojska hiszpańskie, stacjonujące na południe od rzeki Rio de la Plata, na terenie dzisiejszych Argentyny i Urugwaju. Dla króla kontrola nad tym terytorium była niezwykle istotna ze względu na odkryte na północy bogate złoża złota. Postanowił zająć te ziemie, by zapobiec przesuwaniu się Hiszpanów dalej na północ, co groziło przejęciem kopalni. W tym celu zatrudnił mieszkańców Laguny do budowy drogi, którą żołnierze i osadnicy mogliby szybko dotrzeć do krawędzi płaskowyżu.

Archiwa zawierają historię bardzo podobną do podboju amerykańskiego Dzikiego Zachodu, w której osadnicy wymordowali rdzennych mieszkańców i zaczęli zakładać własne wioski i osady wzdłuż budowanej w głąb lądu drogi. Na przedzie szedł niewielki oddział portugalskich żołnierzy, któremu towarzyszyła duża grupa niewolników. Według Hainauta biali stanowili najprawdopodobniej główną siłę polityczną w nowych osadach rozciągniętych wzdłuż drogi do Araranguí i żeby

zachować swój elitarny status, dopuszczali małżeństwa jedynie we własnym gronie.

„Oznaczało to, że bardzo wąska grupa ludzi pochodzących z jednego miasta dała początek całej białej populacji na tym obszarze. Sądzę, że ktoś z nich był nosicielem mutacji, która później, przez kolejne małżeństwa, bardzo szybko upowszechniła się w całej społeczności. Te specyficzne uwarunkowania historyczne i demograficzne mogłyby wyjaśniać, dlaczego mutacja została utrwalona mimo tak negatywnych skutków".

W połowie XVIII wieku droga sięgała dzisiejszego miasta Sorocaba, a później zaczęła szybko się wydłużać, prowadząc od Sao Paulo na północy do Porto Alegre na południu, bardzo szybko stając się uczęszczanym szlakiem handlowym. Przedmiotem handlu było głównie bydło, pędzone z południa na targ w Sorocabie, gdzie wymieniano je na rozmaite potrzebne przedmioty, które handlarze zabierali na mułach z powrotem. Podróż w obie strony trwała sześć miesięcy. Po drodze *tropeiro* zatrzymywali się zapewne wielokrotnie i mieli kontakty z wieloma kobietami, co stwarzało idealne warunki dla rozprzestrzeniania się mutacji.

Niestety, również tej hipotezy nie da się udowodnić, a Patricia Prolla podchodzi sceptycznie do każdego proponowanego dotychczas wyjaśnienia dużej częstotliwość występowania tej mutacji w Brazylii, ponieważ wszystkie one, jej zdaniem, pozostawiają bez odpowiedzi byt wiele pytań. Jednak Hainaut wciąż tych odpowiedzi szuka. Kiedy budowana droga sięgnęła krawędzi płaskowyżu, rozgałęziła się na północ, w kierunku Sao Paulo i Rio de Janeiro, i na południe, w stronę niewielkiej osady, która później rozrosła się, tworząc Porto Alegre. Na czele grupy zmierzającej na południe stał Francisco de Brito Peixoto, znana

postać, która pojawia się na kartach historii jako pierwszy badacz Rio Grande do Sul, najbardziej wysuniętego na południe stanu Brazylii i współzałożyciel, wraz z ojcem, miasta Laguna. Zmarł w 1735 roku i prawdopodobnie został pochowany pod ołtarzem niewielkiej kaplicy w Lagunie. Hainaut marzy o tym, by uzyskać zgodę na ekshumację jego kości i zbadanie DNA, wierząc, że był on pierwszym nosicielem genu p53 z mutacją na kodonie 337.

NIEZWYKŁY WZORZEC CHOROBY

Mutacja, która jest przyczyną przedwczesnych zgonów, zazwyczaj sama ginie w ciągu kilku pokoleń, ponieważ wpływa negatywnie na rozrodczość, a tym samym hamuje przekazywanie wadliwego genu kolejnym generacjom. Jeden z paradoksów brazylijskiej odmiany LFS polega na tym, że jest ona trwalsza i bardziej rozpowszechniona, dlatego że mutacja na kodonie 337 jest w pewnym sensie „słabsza". U nosicieli tego genu ryzyko pojawienia się nowotworu w czasie życia wynosi 60 proc. i zazwyczaj choroba atakuje ich w późniejszym wieku. Dlatego mniej więcej trzy czwarte nosicieli brazylijskiej mutacji dożywa trzydziestego roku życia bez nowotworu, podczas gdy w przypadku „klasycznej" mutacji LFS ma na to szanse tylko połowa nosicieli. Również spektrum występujących nowotworów jest nieco inne, ponieważ w przypadku brazylijskich pacjentów nieco rzadziej pojawiają się białaczki i mięsaki, za to wśród najmłodszych znacznie częstsze są ACC oraz nowotwór centralnego ośrodka nerwowego, nazywany rakiem splotu naczyniówkowego.

Naukowcy badający mutację na 337 kodonie zaobserwowali również dwa inne zjawiska, które mogą podpowiadać, dlaczego

mutacja ta nie została wyeliminowana przez mechanizmy doboru naturalnego. Po pierwsze, nosiciele zmutowanego genu, którzy nie zachorują na raka, zazwyczaj dożywają w dobrym zdrowiu bardzo późnego wieku, często ponad dziewięćdziesięciu lat. Mogłoby to sugerować, że mutacja przynosi również jakieś korzyści, które przynajmniej częściowo równoważą ryzyko raka. Z kolei druga prawidłowość jest taka, że u nosicieli brazylijskiej mutacji nie pojawiają się nowotwory związane z infekcjami wirusowymi, takie jak rak szyjki macicy czy rak wątroby wywołany wirusem HBV. Według teorii Hainauta możliwe jest, że mutacja chroni nosicieli przed infekcjami wirusowymi lub jakimiś innymi chorobami, które nękały pierwszych portugalskich osadników, przez co zwiększa ich szanse przetrwania. Są to oczywiście czyste spekulacje, które jednak – w odróżnieniu od hipotez o pochodzeniu mutacji – można zweryfikować w laboratorium.

Jeśli częstotliwość występowania mutacji na kodonie 337 zaobserwowana podczas badań kontrolnych wśród noworodków w Paranie i podczas programu badań mammograficznych wśród kobiet w Porto Alegre jest reprezentatywna dla całej populacji, oznacza to, że w Brazylii żyje kilkaset tysięcy osób z mutacją genu p53, obciążonych poważnym ryzykiem wystąpienia rozmaitych rodzajów nowotworów. Niewielki ich odsetek stanowią pacjenci specjalistycznych poradni genetycznych, którzy biorą udział w regularnych badaniach prowadzonych przez A.C. Camargo w Sao Paulo i Szpital Kliniczny w Porto Alegre. Systematyczne kontrole zapewniają im spokój i pozwalają na normalne życie. Inni nie potrafią się uwolnić od wiszącego nad nimi fatum raka.

Fernanda (imię zostało zmienione, by chronić prywatność rodziny) to jedna z młodych kobiet obecnych podczas pierwszego

spotkania Achatz i jej kolegów z rodziną z Ibiuny. Poznaję ją osobiście podczas wizyty w małym miasteczku leżącym na obrzeżach metropolii Sao Paulo. Blondwłosa, śliczna, wysportowana i opalona Fernanda siedzi z podwiniętymi nogami na sofie i opowiada mi o tym, jak ciężko zniosła wiadomość o pozytywnym wyniku badań – o tym, że jest nosicielką zmutowanego genu – a także o tym, jak bardzo obawia się przed każdą kolejną wizytą w A.C. Camargo. Mówi, że przejście przez korytarz kliniki w drodze na konsultacje w gabinecie Marii Isabel i widok tylu ciężko chorych ludzi stanowi dla niej zawsze ogromny stres. Obawia się, że ten sam los czeka ją oraz jej najbliższych i przypomina sobie długotrwałą, zakończoną porażką, walkę matki z nowotworem.

W Porto Alegre mężczyzna, który widział, jak jego żona i jedenastoletnia córka umierają na raka w odstępie kilku tygodni, ciągle nie może się pogodzić z faktem, że jego kilkuletni syn również jest nosicielem zmutowanego genu. Jak mówi jego szwagierka, Margarete, czuje on, że stracił grunt pod nogami i w jego życiu nic już nie jest pewne. To ona pilnuje, żeby chłopiec regularnie przechodził badania; dla jego ojca to zbyt duży stres. Margarete to czarująca, atrakcyjna kobieta przed czterdziestką. Ma ogromne ciemne oczy, długie, błyszczące czarne włosy i ciężkie srebrne pierścionki na palcach. Zgodziła się ze mną porozmawiać w pokoiku obok poradni, w której Patricia Prolla przyjmuje pacjentów i ich rodziny.

Margarete ma wypisany na twarzy ogromny smutek i oczy pełne łez, kiedy mówi, że jest w szpitalu po raz pierwszy od czasu, gdy jej siostrzenica zmarła na raka mózgu kilka miesięcy wcześniej. Siedziała przy dziewczynce przez ostatnich 20 dni jej życia i po prostu trzymała ją za rękę, kiedy lekarze robili

wszystko, by ulżyć cierpieniu małej. Margarete cieszy się, że może zrobić coś, żeby chronić swojego siostrzeńca, ale sama nie poddała się badaniom na obecność zmutowanego genu. Wzrusza ramionami i odwraca wzrok. Mówi, że woli nie wiedzieć. „Co ma być, to będzie" – dodaje, pocieszając się, że jest bardziej podobna do ojca, który nie był nosicielem mutacji, niż do matki, u której mutację zidentyfikowano.

Dopóki rząd brazylijski nie zdecyduje, jakie działania podjąć, by poradzić sobie z zagrożeniem zdrowia publicznego wywołanym przez mutację genu p53, członkowie rodzin noszących wadliwy gen mają alternatywę: pogodzić się z losem albo desperacko walczyć na własną rękę. Póki co, badając LFS, naukowcy zbliżają się do uzyskania odpowiedzi na jedno z najważniejszych pytań, jakie pojawiają się w badaniach nad p53: Czy mutacja genu powoduje tylko utratę przez niego funkcji i cech typu dzikiego, czy też zmienia go w onkogen, który w określonych warunkach może powodować powstawanie nowotworów.

ROZDZIAŁ 18

Doktor Jekyll i pan Hyde

...w którym dowiadujemy się, że naukowcy zatoczyli pełne koło, by zrozumieć, że niektóre wersje zmutowanego genu p53 rzeczywiście zachowują się jak onkogeny i aktywnie stymulują rakowacenie zbuntowanych komórek, a nie tylko tracą swoją zdolność funkcjonowania w roli supresorów nowotworowych.

* * *

Mówi się, że najpierw trzeba poznać wszystkie fakty. Tymczasem niektóre z nich mogą nas zwodzić. Jeśli więc będziemy traktować je zbyt poważnie, możemy nigdy nie odkryć prawdy. Można powiedzieć, że jeśli za bardzo przesiąkniesz jakąś ideą i zbyt dużo o niej rozmawiasz, to tracisz zdolność krytycznej oceny [sytuacji] i nie jesteś w stanie przyjąć do wiadomości, że może ona być błędna.

James Watson

Kiedy 10 lat po odkryciu genu p53 naukowcy stwierdzili, że jego zwykła odmiana jest supresorem nowotworowym, a nie onkogenem (lub „aktywatorem" nowotworów), wielu z nich całkowicie straciło zainteresowanie mutacjami, które wcześniej tak długo – niepotrzebnie – badali. Zamiast tego skoncentrowali się całkowicie na typie dzikim, wierząc, że stwarza on mnóstwo

nowych, ciekawych możliwości. Bardzo szybko zapomnieli o tym, co zaobserwowali, badając zmutowane geny. Nielicznych, którzy nadal twierdzili, że przecież te zmutowane geny mogą rzeczywiście przyczyniać się do powstawania nowotworu – bardziej niż tylko przestając hamować rozwój nieprawidłowych komórek – przestano słuchać. „Była to reakcja na fakt, iż klony zmutowanego p53 wprowadziły nas w błąd, a na podstawie ich obserwacji wyciągnięto wiele błędnych wniosków" – ocenia Moshe Oren. „Były dla nas solą w oku i wielu chciało jak najszybciej o nich zapomnieć".

Ale nie Varda Rotter. Być może pamiętacie ją z Rozdziału 7 i jej udziału w rewolucyjnych odkryciach, które doprowadziły do uznania p53 za gen supresorowy. W latach 1979–80 jej doświadczenia z wirusem białaczki Abelsona zakończyły się wykryciem złośliwych komórek zupełnie pozbawionych białka p53, co było całkowicie sprzeczne z ustaleniami jej kolegów, którzy w badanych komórkach rakowych obserwowali zawsze nadmiar tego białka. Rotter odkryła, że wirus blokował gen p53 i uniemożliwiał mu produkcję białek, umieszczając w nim fragment swojego materiału genetycznego.

Chcąc sprawdzić efekt braku p53 w złośliwych komórkach, Rotter wstrzyknęła je myszom laboratoryjnym. Zaobserwowała, że z komórek rozwijają się niewielkie guzy, które po niedługim czasie ustępują. Następnie, przy pomocy technologicznych sztuczek, z części tych komórek usunęła nieaktywny p53 i zastąpiła go aktywnym, ale zmutowanym genem, zdolnym do wytwarzania białek. Kiedy wstrzyknęła zmienione komórki myszom, zauważyła, że wywołują one niezwykle agresywne, śmiertelne nowotwory. W 1984 roku Rotter opublikowała wyniki swoich badań w magazynie „Cell".

Rezultaty, jakie uzyskała Rotter były na tyle spektakularne, że kiedy pięć lat później okazało się, iż normalna odmiana genu p53 jest tak naprawdę supresorem nowotworowym, a nie czynnikiem napędzającym rozwój raka, uczona wcale nie straciła zainteresowania agresywnymi mutacjami i nie uznała ich za mało istotne. Rotter nie włączyła się w owczy pęd ani nie zmieniła przedmiotu swoich badań i przez pewien czas była jedną z nielicznych zwolenniczek teorii o mutacji powodującej zyskanie przez gen dodatkowej funkcji (ang. *„gain of function" mutation*, GOF). (Być może pamiętacie przytoczone w Rozdziale 7 porównanie do samochodu, w którym blokuje się pedał gazu i wysiadają hamulce. GOF to właśnie zablokowany pedał gazu.) „Oto, co mnie przekonało" – wspomina Rotter, przeglądając pliki w komputerze w poszukiwaniu słynnego zdjęcia przedstawiającego fragment tkanki nowotworowej z zaznaczonymi na czerwono białkami p53. Na obrazie, który mi pokazuje, widać wyraźnie, że każda komórka jest nimi dosłownie wypełniona. „Tak wygląda niemal każdy ludzki nowotwór, w którym oznaczymy białka p53. Widziałaś kiedykolwiek coś, w czym byłoby tak dużo białek?" – zadaje retoryczne pytanie. „Wiedziałam, że to musi mieć jakieś znaczenie".

To przekonanie skłoniło ją do dalszego eksperymentowania z myszami i zmodyfikowanymi złośliwymi komórkami krwi – musiała udowodnić, że przeczucie jej nie myli i że liczne białka wytwarzane przez zmutowany p53 odgrywają jakąś rolę w komórkach rakowych. Jak wyjaśnia, właśnie to sprawia, że p53 odróżnia się od innych genów supresorowych, które są zazwyczaj po prostu eliminowane przez mutację. „W odróżnieniu od innych supresorów, p53 ma podwójną naturę. Mamy typ dziki, który jest niezwykle istotny – to «strażnik genomu», który steruje naprawą

DNA, zapewnia wierne kopiowanie genomu, można powiedzieć, że dba o wszystko. Ale kiedy przejdzie mutację, zamienia się w potwora". Dokładnie tę właściwość ilustruje narysowany przez wnuczkę Rotter obrazek przedstawiający anioła i diabła, wiszący na ścianie w gabinecie badaczki.

Drugą osobą obok Rotter, która pośród całej rzeszy sceptyków stale interesowała się funkcjonowaniem zmutowanych genów, był jej kolega z Instytutu Naukowego Weizmanna, Moshe Oren. To właśnie on, badając aktywność rozmaitych mutacji, natknął się przypadkiem na odmianę wrażliwą na działanie temperatury, kiedy termostat w jednym z inkubatorów w laboratorium zaczął się psuć. Jak zapewne pamiętacie, zaobserwowano w ten sposób, że p53 może indukować apoptozę, czyli samobójstwo komórek. Przyczyniło się to także do innego, równie ważnego, odkrycia na temat natury genu p53 – że normalne białko typu dzikiego może zmieniać swój kształt i tym samym swoją funkcję w komórce, stając się, w zależności od warunków, supresorem lub czynnikiem wzrostu. Choć dziś powszechnie uznaje się, że to cecha wielu białek kontrolujących zachowanie innych białek w komórce, to w chwili odkrycia p53 taka elastyczność kształtu i zachowania pojedynczego białka była zupełnie niespotykana. Jak się przekonamy, rzuciło to światło na tajemnice wykraczające daleko poza dziedzinę biologii nowotworów.

NADZWYCZAJ ELASTYCZNE BIAŁKO

Badaczką, która odkryła tę niezwykłą cechę białka, jest Jo Milner. To właśnie ona opracowała tak zwaną „hipotezę konformacyjną" p53. Milner, którą Oren opisuje jako „niezwykle inteligentną i oryginalną osobę", zaczęła się interesować biologią już

w okresie dzieciństwa spędzonego w Bridlington, nadmorskim miasteczku na północno-wschodnim wybrzeżu Anglii. Długie, beztroskie dni schodziły jej tam na spacerach po plaży i wyszukiwaniu rozgwiazd. Wieczorami wracała do domu z wypełnionymi nimi kieszeniami. Matka Milner, która samotnie wychowywała dzieci po II wojnie światowej, stymulowała ciekawość i otwartość u Jo i jej rodzeństwa. Milner wspomina, że czasy były ciężkie, „ale nigdy tego nie odczuwaliśmy. Dorastaliśmy w małym domku pełnym przyjaciół, którzy traktowali naszą mamę jak własną".

„Do dziś pamiętam tamten poranek, kiedy, jadąc pociągiem, zobaczyłam, jak w oddali ktoś macha do mnie białym prześcieradłem z okna na piętrze dużego domu. Jechałam na egzamin do Londynu, a w tym domu moja matka pracowała jako gospodyni. I to ona właśnie do mnie machała, żegnając się ze mną i życząc mi powodzenia".

Po ukończeniu zoologii na londyńskiej uczelni, Milner odbyła studia doktoranckie na Uniwersytecie Cambridge. Kontynuowała karierę na Harvardzie, potem ponownie w Cambridge, a w końcu na Uniwersytecie Yorku, gdzie do niedawna kierowała Zakładem Badań nad P53 na Wydziale Biologii. Odwiedzam ją, gdy odchodzi ze stanowiska i przygotowuje się do przejścia na emeryturę, w czasie której zamierza nadal poszukiwać odpowiedzi na rozmaite pytania nurtujące ją jako badacza, tyle że już bez obciążeń związanych z kierowaniem zespołem. Siadamy w słonecznym pokoju w jej eleganckim kamiennym domu na wsi pod Yorkiem, wśród delikatnej woni limonki roztaczanej przez rosnące w doniczce drzewko, a Jo zaczyna opowiadać o kolejnych krokach, które doprowadziły do odkrycia

wyjątkowej elastyczności genu p53 – jednego z tych rzadkich i elektryzujących momentów w życiu naukowca.

Milner od zawsze zadawała sobie pytanie, w jaki sposób komórki przechodzą z fazy uśpienia czy też spoczynku do stanu, w którym zaczynają się dzielić, co w normalnych warunkach jest konieczne dla rozwoju lub naprawy tkanki. Odpowiedzi poszukiwała, badając zdrowe białe krwinki. Zwykle pozostają one uśpione w laboratoryjnej pożywce do chwili, kiedy naukowcy, dodając rozmaite czynniki, zaczynają stymulować ich podział. Biochemicznym „narzędziem" używanym przez Milner w doświadczeniach były różnego rodzaju antybiotyki. Jeden z nich, toksyna pozyskiwana z trującego grzyba, hamuje syntezę białek i zatrzymuje metabolizm w komórkach, sprawiając, że przestają funkcjonować i umierają.

Milner zauważyła jednak, że jeśli toksyna działa na komórki tylko przez krótki okres, skutki tego oddziaływania są odwracalne. Opracowała metodę, która pozwalała jej zatrzymać procesy w komórkach na chwilę, tuż przed rozpoczęciem podziału, a następnie usuwała toksynę, uruchamiając ponownie cykl komórkowy. Wykorzystując tę metodę, znalazła dowody jednoznacznie potwierdzające działanie genu wytwarzającego białko, który pojawiał się w komórkach na krótką chwilę i stymulował przejście ze stanu uśpienia w stan podziału, a następnie natychmiast ulegał degradacji i znikał. „Oczywiście, kolejne pytanie brzmiało: co to za gen i jakie to białko?" – wspomina Milner.

Było to niedługo po odkryciu genu p53 i ukazaniu się artykułu Lane'a i Levine'a. Przeczytawszy go, Milner uznała, że może dobrze by było, na wszelki wypadek, sprawdzić ten gen. Udało jej się zdobyć dwa różne rodzaje przeciwciał przygotowanych

specjalnie do rozpoznania i oznaczenia p53 obecnego w komórkach. Przy pomocy przeciwciał odkryła, że w komórkach rzeczywiście następuje ekspresja p53 i synteza białka. Jedno z przeciwciał rozpoznawało białko w komórkach w fazie uśpienia a drugie w komórkach tuż przed podziałem. Żadne z nich nie identyfikowało białka w obu tych stanach jednocześnie. Wydawało się, że właśnie to białko może być odpowiedzialne za inicjowanie procesu podziału komórek. Skąd jednak wynikały różnice – tak duże, że żadne z przeciwciał dopasowanych specjalnie do p53 nie wykrywało białka na obu etapach cyklu komórkowego? „Przychodziła mi do głowy jedynie taka odpowiedź, że oto mamy do czynienia z białkiem, które zmienia swoją konformację (czy też strukturę). Tak więc w pierwszej konformacji jeden epitop (ściana cząsteczki, do której przyczepia się przeciwciało) jest odsłonięty, a drugi ukryty" – opowiada Milner i zaciska pięść, by zademonstrować, jak wygląda zwinięte białko wystawiające jedną ze ścian w stronę przeciwciała. „A potem, kiedy następuje stymulacja, konformacja zmienia się i odsłania się drugi epitop". Jo otwiera lekko pięść, by pokazać, jak białko zwija się w inny sposób, odkrywając drugą ścianę.

Był to rewolucyjny pomysł, lecz wyniki badań zrodziły kolejne pytanie: Czy jest to pojedyncze białko, zmieniające swój kształt, czy też dwa – nieznacznie różniące się – typy białka wytwarzanego przez ten sam gen do inicjowania zmian stanu komórki? I w tym momencie do opowieści ponownie wkracza wrażliwy na temperaturę typ mutacji p53, odkryty przez Moshe Orena. W trakcie badań nad naturą białka p53 i jego rolą w inicjowaniu podziału komórek, Milner oraz pracujący z nią laborant pojechali na konferencję naukową poświęconą genowi p53. W jej trakcie wysłuchali wystąpienia Orena na temat jego

przypadkowego odkrycia. Dla Milner było to jak olśnienie. „Pomyślałam, że to fantastyczne!" – wspomina. „Uznałam, że możemy sprawdzić tę mutację, by przekonać się, czy nasza teoria o konformacji jest prawdziwa".

Jej pomysł polegał na tym, by przyjrzeć się, w jaki sposób pojedyncze włókno białka wytworzonego przez zmutowany p53 zwija się w różnych temperaturach i sprawdzić, czy sposób zwinięcia decyduje o zmianie zachowania z hamującego na promujące wzrost. Kiedy zaproponowała to doświadczenie Orenowi, miał poważne wątpliwości. Obawiał się, że działania potrzebne do jego przeprowadzenia, takie jak przechowywanie preparatów w lodzie, mogą negatywnie wpłynąć na najważniejszą cechę mutanta, czyli jego wrażliwość na temperaturę. Nigdy wcześniej nie zastanawiał się nad znaczeniem konformacji białka, a poza tym miał inne pomysły na badania z wykorzystaniem zmutowanego genu.

Mimo to Milner nadal sądziła, że warto spróbować i wraz z laborantem rozpoczęła doświadczenia natychmiast po powrocie do Cambridge. „To było po prostu piękne!" – wspomina z uśmiechem na twarzy. „To był naprawdę niezwykły moment, ponieważ wcześniej przez bardzo długi czas bezskutecznie próbowaliśmy wywołać zmiany konformacji, wprowadzając różne czynniki i modyfikując warunki. A teraz mieliśmy mutację, z którą udało się to idealnie. To był jeden z tych szczególnych momentów w życiu...". Znaczenie tego odkrycia było tym większe, że pokazywało ono, iż p53 może zmieniać swoją funkcję – z supresorowej na aktywującą podział [komórki] – bez żadnej dodatkowej mutacji. Wydaje się, że obie te role należą do normalnego repertuaru zachowań białka, a zmiany możliwe są właśnie dzięki elastyczności jego kształtu. Ta elastyczność może

być również wyjaśnieniem, jak to się dzieje, że p53 odgrywa tak zróżnicowaną, subtelną i istotną rolę w komórkach, zarówno zdrowych, jak i chorych. Później okazało się, że ta koncepcja jest szersza i dotyczy nie tylko p53. „Jednak – jak mówi Oren – to właśnie p53 zwróciło naszą uwagę na tę dwoistość funkcji".

EFEKT DOMINUJĄCEJ MUTACJI NEGATYWNEJ

Odkrycie zdolności p53 do samoistnej zmiany kształtu otworzyło drzwi do wszelkiego rodzaju doświadczeń umożliwiających dokładne zrozumienie sposobów funkcjonowania genu. Kolejnym działaniem podjętym przez Milner było zbadanie zjawiska znanego jako efekt „dominującej mutacji negatywnej", które polega na tym, że zachowanie komórki, w której występuje zarówno typ dziki, jak i typ zmutowany tego samego genu, zdominowane zostaje przez typ zmutowany. Zjawisko to nie występowało wcześniej w przypadku genów supresorowych. Wszystkie supresory znane w tamtym okresie zachowywały się zgodnie z modelem Knudsona, w którym komórka z jednym allelem typu dzikiego funkcjonuje prawidłowo do czasu, kiedy jakieś zdarzenie spowoduje uszkodzenie tego allelu. Innymi słowy, typ dziki dominuje nad mutacją.

Jednakże wielu naukowców sceptycznych wobec teorii zyskiwania dodatkowej funkcji – głoszącej, że zmutowany p53 wytwarza białka wyposażone w nowe, nieprawidłowe funkcje – sugerowało, że to, co widzimy w przypadku p53, to właśnie efekt dominującej mutacji negatywnej, a nie zyskiwanie nowej funkcji. W końcu był to zupełnie inny gen supresorowy, który łamał zasady. Gdyby rzeczywiście tak było, znaczyłoby to, że wcale nie obserwowaliśmy zyskania nowej funkcji, ale raczej jej utratę,

do której dochodzi w odmienny sposób – typ dziki genu p53 przestaje być hamulcem, ponieważ zostaje zdominowany przez mutację.

Nikt jednak nie potrafił wyjaśnić, w jaki sposób się to odbywa, zatem celem kolejnego eksperymentu Milner było zbadanie relacji między różnymi odmianami p53 funkcjonującymi w jednej komórce. Chciała sprawdzić, czy działają niezależnie, jako osobne czynniki, czy też łączą się i współpracują. By ułatwić sobie zadanie, zmieszała w probówce ludzkie i mysie geny p53, ponieważ różnią się one nieco wielkością, dzięki czemu łatwiej je obserwować w trakcie doświadczeń. Są jak różnokolorowe klocki Lego – można dokładnie zobaczyć, czy i w jaki sposób się ze sobą łączą, zamiast się zastanawiać, z czego składa się ta bezkształtna masa.

Milner wiedziała, że cząsteczki białka mogą się łączyć w grupy po dwie lub po cztery, tworząc w ten sposób współpracujące jednostki. Teraz wykazała, że takie połączenia są możliwe jedynie w przypadku białek o jednakowej konformacji. Tak więc pomieszane w probówce białka stworzyły grupy supresorów lub promotorów, ale nie było wśród nich ani jednego mieszanego zestawu. Wyraźnie było widać, że to kształt, czyli konformacja, decyduje o tym, czy budujące gen klocki mogą ze sobą współpracować.

W rzeczywistości efekt dominującej mutacji negatywnej pojawia się w przypadku jednoczesnej ekspresji typu dzikiego i zmutowanego białka, czyli wówczas, kiedy oba typy wytwarzane są równocześnie w jednej komórce przez dwa różne allele (różne kopie) tego samego genu. Milner i jej współpracownik zasymulowali tę sytuację w laboratorium, dokonując jednoczesnej ekspresji supresora (typ dziki)

i promotora (typ zmutowany) produkujących białka p53 w mieszance. Była to próba ognia, a jej wynik okazał się spektakularny – oba białka połączyły się w jedną grupę, a przy tym jedynym przeciwciałem, które rozpoznało białko, było to, które zostało dopasowane do rozpoznawania promotora (typu zmutowanego). Tym samym doświadczenie pokazało, że efekt dominującej mutacji negatywnej, o którym dyskutowali naukowcy, jest możliwy, a zarazem wyjaśniło mechanizm, który go wywołuje: jedno nieprawidłowo zwinięte białko p53 w jednostce współpracujących białek może wymusić zmianę kształtu innego białka tak, by je do siebie dopasować.

Badania Milner, prowadzone w sztucznych laboratoryjnych warunkach dostarczyły dowodu. Nikt jednak nie miał pewności, że proces ten przebiega tak samo w warunkach naturalnych. Odkrycia Milner opublikowane w 1991 roku w magazynie „Cell" szybko przyciągnęły uwagę Stanleya Prusinera, równie oryginalnego naukowca, zajmującego się zupełnie inną dziedziną – tak zwanymi encefalopatiami gąbczastymi – chorobami, spośród których najbardziej znanymi są choroba wściekłych krów oraz jej ludzka odmiana, choroba Creutzfeldta-Jakoba (CJD), a także trzęsawka u owiec. Jego hipoteza dotycząca powstawania tych chorób była powszechnie wyśmiewana jako herezja, więc by ją uzasadnić, poszukiwał takiego mechanizmu, jaki opisała Milner.

W 1972 roku Prusiner, pracujący wówczas jako neurolog w szpitalu Uniwersytetu Kalifornijskiego w San Francisco, przyjął na oddział pacjentkę cierpiącą na chorobę Creutzfeldta-Jakoba, która zabija komórki nerwowe w mózgu, pozostawiając ubytki i w konsekwencji nadając mu charakterystyczną gąbczastą strukturę. Pacjentka stopniowo traciła pamięć i zdolność wykonywania najprostszych codziennych czynności. Jej

poprzedni lekarz twierdził, że umiera z powodu infekcji wywołanej przez tzw. „wirusa powolnego". Jednakże mimo wielu lat badań nikomu nie udało się zidentyfikować owego wirusa, określanego w ten sposób ze względu na długi okres wylęgania, czyli czas pomiędzy zakażeniem a wystąpieniem pierwszych objawów.

Jak napisał Prusiner wiele lat później w swoim autobiograficznym szkicu: „Moją uwagę zwróciły niezwykłe właściwości tego domniemanego «wirusa powolnego» i pomyślałem, że niezłym pomysłem mogłoby być przeprowadzenie badań, które pozwoliłyby dowiedzieć się więcej na temat tego nieznanego czynnika i określić jego strukturę molekularną". Jego badania oraz obserwacje stopniowo przekonały go, że w tym wypadku nie ma do czynienia z wirusem ani z żadnym innym znanym czynnikiem zakaźnym, takim jak bakteria lub grzyb, lecz z nieprawidłowo zwiniętym białkiem, które nazwał „prionem". Jednak w jaki sposób substancja pozbawiona DNA, a więc instrukcji umożliwiające replikację, może przenosić choroby? Kiedy Prusiner opublikował swoją hipotezę o prionach w 1982 roku, jego twierdzenia uznano za herezje. Ściągnęły na niego prawdziwą burzę. „Wirusolodzy uznali je za całkowicie niewiarygodne, a badacze zajmujący się trzęsawką i CJD byli zwyczajnie wściekli" – pisał Prusiner. „Określenie «prion», złożone ze słów «białko» [ang. *protein*] oraz «zakaźne» [ang. *infectious*], odebrali jako wyzwanie, by jak najszybciej znaleźć kwas nukleinowy domniemanego «wirusa trzęsawki». Gdyby ktokolwiek odkrył taki kwas, słowo «prion» z pewnością by znikło!".

Oczywiście, nigdy nie znaleziono takiego DNA, za to pojawiało się coraz więcej dowodów potwierdzających nową hipotezę.

W efekcie złośliwe ataki na Prusinera zaczęły stopniowo słabnąć. Jednak uczonemu ciągle brakowało wyjaśnienia, w jaki sposób źle zwinięte białko może uszkadzać zdrowe białka, które wszyscy mamy w mózgach. „Nasz artykuł był pierwszym dowodem na to, że coś takiego jest w ogóle możliwe" – mówi Milner. „Prusiner odwiedzał kolegę w Niemczech i skontaktował się ze mną, żeby umówić się na spotkanie. Zaprosiłam go do siebie do Cambridge i rozmawialiśmy ponad trzy godziny, a potem odwiozłam go na dworzec. To było bardzo ekscytujące spotkanie i bardzo inspirująca wymiana myśli. Uwielbiam takie rozmowy!". Sześć lat później, w 1997 roku, Prusiner otrzymał Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny za swoją teorię prionów, która, choć wciąż ma krytyków, jest obecnie powszechnie akceptowanym wyjaśnieniem śmiertelnych gąbczastych chorób mózgu.

ŻYJE WŁASNYM ŻYCIEM?

Nie wszystkie mutacje genu p53 prowadzą do powstania „konformacyjnych" („strukturalnych") typów zmutowanych, które zachowują się w taki sposób. Typem najczęściej spotykanym w ludzkich nowotworach jest typ „kontaktowy", wytwarzający białka niezdolne do wiązania się z DNA i aktywowania innych genów. W takich przypadkach typ dziki wygrywa i utrzymuje mutanta w ryzach do czasu, aż sam ulega degeneracji. Wraz z pojawianiem się kolejnych rodzajów mutacji genu p53, coraz bardziej intensywna stawała się debata między zwolennikami teorii o „utracie" i „zyskiwaniu" funkcji. Dlatego, na przełomie XX i XXI wieku wiele grup naukowców zaczęło opracowywać

transgeniczne myszy, by podjąć próbę ostatecznego rozwiązania tego sporu i dowiedzieć się, jak naprawdę działa p53.

Jedną z takich grup kierowała Guillermina („Gigi") Lozano, którą poznaliśmy w Rozdziale 13. Prowadziła doświadczenia na modelach myszy w centrum badawczym MD Anderson w Houston. Rodzina Lozano przybyła do Stanów Zjednoczonych z Meksyku w poszukiwaniu lepszego życia. Gigi ukończyła studia i w 1969 roku uzyskała tytuł doktora biochemii na Uniwersytecie Rutgersa w New Jersey. Po obronie doktoratu postanowiła na jakiś czas dołączyć do zespołu Arniego Levine'a prowadzącego laboratorium biologii molekularnej w Princeton, ponieważ jako jeden z pierwszych prowadził on badania na modelach mysich nowotworów. „Kiedy usłyszałam, że można zmanipulować mysi genom w taki sposób, że będzie reagował tak, jak ludzkie nowotwory, byłam zafascynowana. Wiedziałam, że nie ma dla mnie innej drogi" – opowiada ze śmiechem, kiedy spotykamy się w 2013 roku podczas konferencji na temat mutacji p53.

Po stażu u Levine'a Lozano podjęła pracę na wydziale genetyki molekularnej w MD Anderson, gdzie obecnie kieruje Oddziałem Genetyki Nowotworów. Prowadziła doświadczenia przede wszystkim na modyfikowanych genetycznie myszach i na początku XXI wieku opracowała model, który był odwzorowaniem ludzkiego zespołu Li-Fraumeni. W modelu tym gen p53 ma jeden allel typu dzikiego i jeden allel z mutacją „punktową", co oznacza, że zmieniona została tylko jedna litera jego kodu. Naukowcy dość powszechnie tworzyli już wówczas myszy z usuniętym genem lub jednym z alleli, ale przygotowanie modelu z DNA zmienionym tylko w jednym punkcie było zadaniem znacznie trudniejszym, wymagającym czasu, cierpliwości i umiejętności. Lozano i jej zespół wybrali mutację

odpowiadającą mutacji R175H występującej w ludzkich nowotworach, „ponieważ to najgorsza mutacja, jaka może się pojawić" – objaśnia badaczka. „A jeśli tworzysz mysz pierwszy raz w życiu, to mutacja nie może być byle jaka".

W tym samym czasie Tyler Jacks – który w 1992 jako jeden z pierwszych opracowywał myszy pozbawione p53 – podążał tym samym tropem, pracując w Massachusetts Institute of Technology w Bostonie. W jego laboratorium powstawały dwa różne modele transgenicznych myszy odwzorowujące ludzki LFS. W pierwszym wprowadzono tę samą mutację, którą miała mysz tworzona przez Lozano – odpowiadającą ludzkiej mutacji R175H. W drugim – mutację odpowiadającą ludzkiej R273H. Oba zespoły opublikowały wyniki swoich badań w tym samym numerze „Cell" z grudnia 2004 roku. Tym, co odróżniało ich modele od innych myszy wykorzystywanych do badania zmutowanych genów p53 był fakt, że w ich przypadku aktywacja genu następowała naturalnie, w reakcji na sygnały pochodzące z otoczenia komórki. W większości innych modeli gen aktywowany był w sposób sztuczny, przez badaczy – co dawało sceptykom ważny argument. Przekonywali oni, że we wszystkich doświadczeniach ilustrujących proces zyskiwania funkcji dochodziło do nadmiernej stymulacji genu przez badaczy, co w konsekwencji powodowało nadprodukcję białek. Twierdzili, że sztuczna stymulacja zakłóca działanie delikatnego mechanizmu komórkowego i nie daje przekonujących dowodów, że takie nagromadzenie białek – a tym samym zyskiwanie przez nie dodatkowej funkcji – występuje również w warunkach naturalnych.

Jednakże zarówno doświadczenia Lozano, jak i Jacksa pokazały, że wzmożona synteza białek pojawia się również w warunkach

naturalnych. Zgromadzili oni dowody na to, że zyskiwanie funkcji – przynajmniej w przypadku niektórych rodzajów mutacji – jest realnym zjawiskiem, a nie sztucznie wymuszonym procesem. Oba zespoły wykorzystywały w swoich eksperymentach różne odmiany myszy. Oznaczało to, że obserwowano funkcjonowanie zmutowanych genów w różnych środowiskach. To jeszcze bardziej uwiarygadniało wyniki. W celu dodatkowej weryfikacji oba zespoły przeprowadziły także doświadczenia na myszach, u których usunięto jeden z alleli genu p53, pozostawiając jedynie allel typu dzikiego. Również w tym przypadku myszy były podatne na nowotwory, mimo braku mutacji. Dodatkowe eksperymenty pozwoliły naukowcom porównać rezultaty badań nad oboma typami myszy i sprawdzić, czy mutacja ma jakiś wpływ na rodzaj pojawiających się nowotworów.

Dowiedzmy się zatem, co odkryli. Jak można było przypuszczać, różne myszy spotkał różny los. U wszystkich – zarówno tych z jednym allelem zmutowanym (na wzór LFS), jak i tych pozbawionych jednego z alleli (kontrolne) – rozwinęły się nowotwory. W przypadku myszy Jacksa nowotwory, które pojawiły się u wszystkich zwierząt ze zmutowanym p53, były inne niż te, które wystąpiły u zwierząt pozbawionych jednego z alleli. Z kolei u Lozano nowotwory u myszy z mutacją R175H były podobnego typu do tych, które rozwinęły się u myszy z grupy kontrolnej, tyle że dużo agresywniejsze. Rozprzestrzeniały się znacznie szybciej do węzłów chłonnych, płuc, wątroby czy mózgu, podczas gdy u myszy pozbawionych jednego z alleli nowotwory nie dawały żadnych przerzutów.

„Dla mnie był to najbardziej przekonujący eksperyment” – mówi Lozano. „Jeśli porównujemy dwa typy myszy i u jednego z nich występują nowotwory z tendencją do przerzutów,

a u drugiego nie, to jak można zaprzeczyć tezie, że mutacja powoduje zyskiwanie funkcji? No właśnie, nie można!". Argumentem, który ostatecznie przekonał środowisko naukowców badających p53 [do hipotezy o zyskiwaniu funkcji] – w tym również część zatwardziałych sceptyków – był fakt, że zarówno w doświadczeniach Jacksa, jak i Lozano u myszy pojawiły się nowe rodzaje nowotworów, które nie występowały u zwierząt pozbawionych p53. Mogło to oznaczać tylko jedno – mutacja wywoływała szersze efekty niż tylko zmianę alleli typu dzikiego i upośledzenie ich funkcji ochronnych. Oczywiste stało się, że zmutowany gen żyje własnym życiem.

Te oraz inne modele myszy pozwoliły naukowcom stopniowo stworzyć pełen obraz funkcjonowania zmutowanych genów i ich interakcji z typem dzikim p53. Okazało się, że ogromnie ważny jest kontekst. Działanie zmutowanych genów zależy nie tylko od rodzaju mutacji. W różnych komórkach, tkankach i narządach, a także u różnych odmian badanych myszy (a zatem prawdopodobnie także u różnych ludzi) funkcjonują one inaczej. Niezwykle istotny jest także czas. W niektórych typach nowotworów mutacja p53 następuje na wczesnym etapie, w innych pojawia się, kiedy guz jest już rozwinięty i może (jak to się dzieje w przypadku raka jelita grubego) stanowić punkt zwrotny, wywołujący uzłośliwienie łagodnej narośli.

Jeśli chodzi o mechanizm działania, wydaje się, że zmutowane p53 współpracują czasem z innymi onkogenami, takimi jak Ras, napędzając rozwój nowotworu. W innych przypadkach osiągają ten cel w wyniku interakcji z innymi białkami w komórce – zazwyczaj z którymś z najbliższych krewnych p53, białkiem p63 lub p73, które również wykazują niektóre cechy supresorów nowotworowych i które także mogą ulegać mutacji. Niektóre

zmutowane typy p53 mogą, podobnie jak typ dziki, aktywować inne geny i kontrolować ich działanie. Jest to jednak swego rodzaju parodia prawidłowych zachowań – zmutowany p53 uruchamia zazwyczaj inne geny niż typ dziki będący supresorem, więc ich działanie może przynieść odwrotne skutki. Zmutowane geny wyróżnia także to, że znacząco zwiększają odporność komórki na sygnały wzywające do samounicestwienia. W ten sposób nie tylko wspierają rozwój nowotworu, ale także utrudniają leczenie, ponieważ większość terapii nowotworowych opiera się na wykorzystaniu narzędzi indukujących apoptozę.

Dodatkowym, nieoczekiwanym wynikiem doświadczeń zespołu Lozano było odkrycie, że nadekspresja białka p53 nie jest nieodłączną cechą zmutowanych genów, jak wcześniej przypuszczano. Nagromadzenie białek występuje tylko w komórkach nowotworowych, podczas gdy w normalnych komórkach otaczających guz są one ledwo wykrywalne. Pokazuje to, że w normalnej sytuacji zmutowane białka są produkowane i ulegają degradacji w takim samym tempie jak typ dziki. Sytuacja zmienia się, kiedy jakieś wydarzenie powoduje przerwanie cyklu. Mimo wielu teorii, nikt jeszcze nie wie dokładnie, jak i dlaczego to się dzieje. Wiadomo tylko, że nadekspresja zmutowanych białek jest warunkiem koniecznym, by zaczęły one działać jako czynnik promujący wzrost nowotworu.

POTWIERDZENIE

W chwili, gdy silne przekonanie Vardy Rotter o znaczeniu zmutowanego genu p53 potwierdziło się, znalazł się on ponownie w centrum zainteresowania naukowców. Podejmują oni rozmaite

wysiłki, by poznać i zrozumieć jego biologię. W tekście dla „Cold Spring Harbor Laboratory Press" w 2012 roku Carol Prives i William Freed-Pastor napisali: „W ciągu ostatnich pięciu lat odkryliśmy, że rozmaite mutacje genu p53 aktywnie przyczyniają się do przetrwania, rozprzestrzeniania się i niekończącej się replikacji nowotworów, przeprogramowania komórek somatycznych (zmiana zróżnicowanych komórek z powrotem w komórki macierzyste), niestabilności genetycznej, wywoływania stanów zapalnych, zakłóceń struktury tkanki, migracji, inwazji, angiogenezy (zapewnienia dopływu krwi do nowotworu) oraz rozsiewu nowotworów". Stwierdzili, że potwierdza to kluczową rolę mutacji genu p53 w rozwoju złośliwych nowotworów i ich wpływ na niemal wszystkie znaki szczególne raka – 10 cech charakterystycznych dla wszystkich nowotworów, opisanych w 2000 roku przez Boba Weinberga i Douga Hanahana.

Dlatego właśnie na tym niezwykłym białku koncentrują się rozmaite terapie antynowotworowe. Zarówno naukowcy, jak i koncerny farmaceutyczne nieustannie poszukują nowych, skuteczniejszych metod leczenia raka, które nie będą jednocześnie powodować tak masowych zniszczeń wśród zdrowych komórek w ludzkim ciele.

ROZDZIAŁ 19

Nowotwory i starzenie się – próba sił?

...w którym dowiadujemy się, że starzenie się to cena, jaką płacimy za ochronę przed rakiem – zmarszczki, osłabienie tkanek i ubytki kości są wynikiem senescencji komórek oraz stopniowego zmniejszania się liczby komórek macierzystych, stanowiących główny materiał naprawczy ludzkiego ciała.

* * *

Nauka w najlepszym wydaniu polega na odnajdywaniu odpowiedzi na te pytania o świat, które nie zostały zadane.

John Maddox[40]

Larry Donehower, badacz myszy z Baylor College of Medicine w Houston, lubi wywoływać sensacje. W 1992 roku, pracując wspólnie ze swoim kolegą Allanem Bradleyem, stworzył pierwszą mysz pozbawioną genu p53. Wykorzystując technologię opracowaną nieco wcześniej przez Capecchiego, Evansa i Smithiesa, usunął gen z komórek macierzystych embrionów myszy a następnie wszczepił te embriony myszy, która później wydała na świat młode osobniki pozbawione genu. Kiedy nieco później pojawił się na konferencji poświęconej p53, by przedstawić wyniki swych badań, został przyjęty z wyraźnym

wyczekiwaniem, choć większość słuchaczy była przekonana, że wie, co usłyszy. Właśnie odkryto, że normalny p53 jest supresorem nowotworowym, a nie onkogenem. Zaleziono go niemal we wszystkich organizmach wielokomórkowych; ewolucja zachowała go w niezmienionej formie, posiadającego te same funkcje od zarania dziejów. A w dodatku jeszcze został nazwany „strażnikiem genomu". To było jasne: myszy Donehowera musiały potwierdzić, że bez p53 życie jest niemożliwe.

Ale badacz nie to miał zamiar powiedzieć. Jego zmodyfikowane genetycznie myszy czuły się świetnie. Nie tylko bez ochrony „strażnika" przetrwały okres intensywnego wzrostu, podziału i różnicowania komórek, podczas którego embrion zamienia się w młodego osobnika, ale także nie okazywały żadnych oznak deformacji ani nowotworów. Słuchaczy Donehowera dosłownie zamurowało.

David Lane doskonale przypomina sobie ten moment, gdy rozmawiam z nim w trakcie prac nad książką, przy okazji konferencji w Liverpoolu. „Jako społeczność byliśmy wszyscy w bardzo triumfalnym nastroju. Myśleliśmy: *P53 to najważniejsze białko na świecie, a reszta może się wypchać*! Albo: *I kto nam teraz powie, że marnowaliśmy czas przez ostatnie dziesięć lat?* Byliśmy podekscytowani i pewni siebie" – mówi z uśmiechem. „Warsztaty poświęcone p53 zorganizowane w Stanach, zamiast dwudziestu osób, przyciągnęły niemal dwie setki badaczy... Było mnóstwo pozytywnych danych, wszyscy znajdowali nowe mutacje i wszystko wyglądało coraz bardziej przekonująco. Aż tu nagle wstaje Larry i mówi: «Stworzyłem mysz pozbawioną p53 i zauważyłem parę ciekawych rzeczy... Po pierwsze, to jak najbardziej wykonalne. Po drugie, nie ma żadnych widocznych defektów, no i z pewnością nie ma raka!». Wszyscy jęknęli: «O

nie!»" – Lane odchyla się na krześle i wybucha śmiechem. „Oczywiście jakieś dwa miesiące po konferencji Larry zaczął dostrzegać masowy rozwój nowotworów u wszystkich zwierząt i całe środowisko odetchnęło z ulgą... Myszy miały pecha, ale my szczęście!". Lane przerywa, by wspomnieć 20 lat, które minęły od tamtej konferencji. „To było naprawdę niewiarygodne. A później okazało się, że możliwość wykorzystania myszy pozbawionych p53 zmieniła bardzo wiele".

Donehower, podobnie jak inni, był zaskoczony początkowymi wynikami swoich doświadczeń. Dodatkowo w jego przypadku miały one konsekwencje wykraczające poza kwestie naukowe. Ogromny wysiłek włożony w badania oraz pieniądze przeznaczone na ich wsparcie wiążą się z wysokimi oczekiwaniami i presją na wynik. Kiedy „nic" się nie dzieje, pojawia się panika i w całym środowisku zaczynają narastać wątpliwości. Na szczęście w odpowiednim czasie znokautowane myszy Donehowera zachorowały na raka i zdechły przed upływem 5 miesięcy (podczas gdy normalne myszy, podobne pod względem genetycznym, żyły z nowotworem około 30 miesięcy). Dalsze badania wykazały także, że znokautowane myszy bez p53 mają znacznie mniej liczne mioty, co wskazywałoby, że gen pełni również jakąś funkcję w procesie reprodukcji. Doświadczenia zasygnalizowały też istotną rolę p53 w regulacji metabolizmu, co obecnie jest jednym z najgorętszych tematów badań.

Powróćmy jednak do kwestii starzenia się. W 2002 roku Larry Donehower i jego zespół po raz drugi włożyli kij w mrowisko, kiedy w jednym z doświadczeń popełnili błąd, który doprowadził do zaskakujących wyników. Wykorzystując inną niż dotychczas technologię, próbowali stworzyć mysz pozbawioną p53, jednak

zamiast tego otrzymali zwierzę, u którego gen p53 nie tylko był nadal obecny, ale stał się hiperaktywny. Oczywiście, jak można było przypuszczać, stworzenia okazały się znakomicie chronione przed nowotworami. Z drugiej strony jednak zaczęły się szybko starzeć, co było ogromną niespodzianką. Po zaledwie kilku miesiącach wyglądały jak bardzo stare myszy. „Były zgarbione, miały zmierzwioną sierść i siwiały. A poza tym żyły o jedną trzecią krócej niż inne" – Donehower opowiada mi podczas naszego spotkania w Nowym Jorku. „Niektóre najciekawsze odkrycia naukowe są zupełnie przypadkowe. Znajdujesz zupełnie nie to, czego szukasz. Pamiętam, że to była właśnie taka sytuacja. Opisaliśmy ją w «Nature» w 2002 roku. Przypadkowe odkrycie zainaugurowało zupełnie nowy obszar badań dotyczących wpływu tego niezwykle istotnego genu na proces starzenia się".

Naukowcy od wielu lat wiedzieli, że starzenie się i nowotwory są ze sobą powiązane, a ryzyko wystąpienia raka rośnie wraz z wiekiem. Ale nawet oni nie przypuszczali, że mogą to być dwie strony tego samego medalu, dwie szalki tej samej wagi, która może przechylić się w każdą stronę. Innymi słowy, zmarszczki na skórze, ubytki kości oraz niesprawne narządy to cena, jaką musimy w dłuższym okresie zapłacić za utrzymanie raka na dystans. Odkrycie Donehowera pozostawiło jednak cień wątpliwości dotyczących roli p53, ponieważ w „wypadku", który doprowadził do powstania hiperaktywnej wersji, usunięty został również fragment DNA leżący powyżej genu supresorowego. Nie można było wykluczyć, że to właśnie brak tego fragmentu mógł odpowiadać za przedwczesne starzenie się zwierząt. Szczęśliwie, niedługo później z kierowanego przez Heidi Scrable laboratorium na Uniwersytecie Wirginii w Charlottesville przyszły dowody potwierdzające rację Donehowera. Heidi i jej zespół opracowali

model myszy, w którym jedyną zmianą DNA było zastąpienie jednego allelu p53 hiperaktywną wersją genu. Efekt tego eksperymentu był taki sam – przedwczesne starzenie i śmierć.

Donehower, Scrable oraz inni naukowcy działający w tym niezwykle interesującym obszarze zdołali stopniowo ułożyć pełny obraz tego procesu. Hormon znany jako insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (nazywany w skrócie IGF-1), który, jak można się domyślić, odgrywa kluczową rolę we wzroście i podziale komórek, od dawna znany jest również jako czynniki wywołujący starzenie się różnego rodzaju organizmów, począwszy od muszek owocowych przez nicienie aż po myszy. Modyfikując siłę sygnałów wysyłanych przez hormon do komórek, naukowcy zdołali zmienić długość życia tych stworzeń. Efekty były najlepiej widoczne u muszek i nicieni, które żyły znacznie dłużej, kiedy sygnały od IGF-1 były tłumione, a znacznie krócej, kiedy sygnały były wzmacniane.

Scrable i jej współpracownicy odkryli, że hiperaktywny p53 obecny u zmodyfikowanych myszy wywoływał zwiększoną aktywność hormonu wzrostu. Z kolei, wzmocnione sygnały od IGF-1 uruchamiały mechanizm kontrolny wprowadzający zbuntowane komórki w stan senescencji, czyli stan spoczynkowy oznaczający trwałą utratę zdolności do podziału. Tak właśnie wygląda funkcja supresorowa w praktyce. Zazwyczaj steruje nią „normalny” p53. W tym względzie była to właściwa i korzystna reakcja. Jednak komórki w stanie senescencji stają się dysfunkcyjne i kiedy gromadzą się w tkankach, same zaczynają stwarzać problemy.

W przeciwieństwie do komórek obumarłych w wyniku apoptozy, komórki w stanie senescencji pozostają żywe i aktywne, a także, co ważne, wpływają na mikrośrodowisko

tkanek, przechowując białka, które komunikują się z sąsiednimi komórkami, a czasem nawet z odległymi narządami. Niektóre z tych białek są istotne dla supresji nowotworów – na przykład hamują one rozwój nowych naczyń krwionośnych, które mogłyby dostarczać pożywienia rozwijającemu się guzowi. Jednak podlegając procesom metabolicznym, komórki w stanie senescencji wytwarzają duże ilości materiału, który przenika do okolicznych tkanek. „To zaczyna wypierać macierz międzykomórkową, ową mieszankę, która skleja ze sobą komórki" – wyjaśnia mi w trakcie naszej rozmowy w Nowym Jorku Judith Campisi, badaczka zjawiska senescencji z Buck Institute for Research on Ageing w Berkeley w Kalifornii. „Najważniejszym białkiem międzykomórkowym, które sprawia, że wyglądamy młodo, jest kolagen. A komórki w stanie senescencji wytwarzają cząsteczki, które niszczą kolagen".

Campisi, ciemnowłosa, drobna kobieta z długimi przyciągającymi wzrok kolczykami w uszach i smukłą figurą baletnicy, podkreśla swoje słowa ruchami rąk i wyrazem oczu. Zaczęła karierę naukową od badań nad rakiem i wtedy właśnie po raz pierwszy zetknęła się ze zjawiskiem senescencji jako jednym z elementów supresji nowotworów. Szybko jednak zainteresowała ją także kwestia możliwego związku między komórkami w stanie senescencji a normalnym procesem starzenia – koncepcja odrzucana bardzo długo przez niemal wszystkich naukowców, z wyjątkiem „garstki szaleńców". „Nie kupiłam [tej teorii] od razu" – wspominała Campisi w rozmowie z jednym ze swoich kolegów z Buck na początku 2013 roku. „[Ale] oczywiście kiedy zaczęliśmy badać ten problem, musiałam zdać sobie sprawę, że ta «garstka szaleńców» tak naprawdę miała rację".

Niewtajemniczonym te początkowe wątpliwości naukowców mogą wydawać się dziwne. Już sam termin „senescencja”[41] kojarzy się ze starzeniem. Taka była zresztą intencja Leonarda Hayflicka, który w 1961 roku odkrył i opisał tym słowem stan spoczynku komórek – choć było to ryzykowne z naukowego punktu widzenia. Jak wspomina Campisi, „Len Hayflick był mikrobiologiem i badał namnażanie komórek z jednego, konkretnego powodu – próbował wyhodować wirusa w ludzkich kulturach komórkowych, a nie w kulturach zwierzęcych. Dla wirusologów było to prawdziwe wyzwanie. Początkowo udawało im się wyhodować kulturę i wszystko szło świetnie, a potem nagle przestawało. Musieli wyrzucać kolejne kultury i zaczynać od początku”. Hayflick postanowił przyjrzeć się temu dokładniej i dokonał zaskakującego odkrycia: okazało się, że odwrotnie niż u komórek nowotworowych, u zdrowych ludzkich komórek zdolność do podziałów jest skończona. „Chociaż zdolność ta jest ograniczona, to jednak jest zarazem bardzo duża” – wyjaśnia Campisi. „W przypadku komórek macierzystych pobranych z ludzkiego płodu mówimy o 40, 50 lub 60 podwojeniach populacji. Widzisz więc, że można dać się nabrać – robisz eksperyment przez trzy miesiące, komórki mnożą się znakomicie, a potem zaczynają zwalniać i w końcu całkiem się zatrzymują”.

„Dwie obserwacje Hayflicka były bardzo ciekawe” – kontynuuje. „Pierwsza była oczywista i od razu została zaakceptowana. Brzmiała: «O mój Boże, komórki rakowe tak nie robią. Może jest w tym jakiś sposób na powstrzymanie nowotworu». Uruchomiło to cały nowy obszar badań nad senescencją kontrolowaną przez słynny gen supresorowy p53 – metodą powstrzymania rozwoju nowotworów. Myślę, że ta

kwestia nie budzi dziś specjalnych kontrowersji. Ale Hayflick zauważył coś jeszcze. To spostrzeżenie nie miało żadnego naukowego uzasadnienia, było czysto intuicyjne, oparte na jego wyczuciu i doświadczeniu mikrobiologa. Spojrzał w mikroskop, popatrzył na komórki i powiedział: «One wyglądają staro». Ale co to znaczy, że komórka wygląda «staro»? Przecież to zjawisko niemierzalne. Hayflick dodał: «Może jest tak, że w naszych kulturach odtwarzamy również jakieś aspekty starzenia się». Obserwacja ta przeszła w środowisku bez echa. Zwrócili na nią uwagę nieliczni obdarzeni wyobraźnią koledzy Hayflicka, którzy zaczęli badać senescencję, ale nie jako narzędzie supresji nowotworów, lecz jako aspekt procesu starzenia [komórek]. Kwestia ta wciąż wzbudza wątpliwości – może już nie takie, jak 50 lat temu, jednak wciąż żywe. Z drugiej strony zainteresowanie tym tematem rośnie, a badania nabierają rozmachu".

Maksymalna liczba podziałów normalnej zdrowej komórki nazywana jest dziś limitem Hayflicka i zależy od długości telomerów znajdujących się na końcach chromosomów. Telomery to końcówki zabezpieczające chromosomy, podobne do plastikowych nakładek na sznurówkach, które zapobiegają ich strzępieniu. Przy każdym podziale komórki telomer ulega skróceniu, aż w końcu przestaje chronić chromosom przed uszkodzeniem. Wtedy proces podziału zostaje trwale zatrzymany. I choć nie jest to jedyna droga prowadząca do senescencji komórki, to niebezpieczne skrócenie telomerów jest jednym z bodźców uruchamiających reakcję p53.

Dziś Judith Campisi jest światowym autorytetem w dziedzinie senescencji. Jest przekonana, że komórki w stanie spoczynku są kluczowym elementem mechanizmu i mogą zdecydować o jego wychyleniu się w jedną ze stron. „W swojej pracy staram się

w jakiś sposób pogodzić oba, tak bardzo różne, poglądy na temat senescencji. Jeden z nich głosi, że to bardzo dobre zjawisko, ponieważ hamuje rozwój nowotworów. Według drugiego, proces ten – jako związany ze starzeniem – jest raczej niekorzystny. Sprawia, że komórki wyglądają na stare i zniszczone".

Jak powiedziała Campisi swojemu współrozmówcy z Buck Institute, badacze z jej laboratorium odkryli niedawno, że komórki w stanie senescencji wywołują stany zapalne, będące podłożem niemal wszystkich chorób związanych z procesem starzenia się. „Zauważyliśmy, że jedna komórka senescentna, znajdująca się wśród wielu aktywnych komórek, może wywołać stan zapalny obejmujący również inne komórki. To mogłoby potwierdzać hipotezę, że nawet niewielka liczba komórek w stanie senescencji może spowodować wystąpienie zmian zwyrodnieniowych, charakterystycznych dla starzejących się organizmów".

Komórki senescentne są również bardzo odporne na apoptozę i paradoksalnie z czasem one same mogą przyczyniać się do rozwoju nowotworów, wspomagając proces niekontrolowanego podziału. Jak to jest możliwe? „W ciągu ostatnich kilku lat dowiedzieliśmy się, że senescencja pełni jeszcze jedną funkcję, a mianowicie wspiera naprawę uszkodzonych tkanek" – mówiła Campisi. „I to może stać się przyczyną problemów w późniejszym życiu". Kiedy z czasem komórki senescentne stają się dysfunkcyjne, mogą zacząć wysyłać sygnały inicjujące naprawę i podział komórek, nawet jeśli nie doszło do żadnego uszkodzenia. W ten sposób mogą napędzać rozwój nowotworów.

Oczywiście można tego uniknąć. Jak odkryli naukowcy, dla każdego aspektu supresji nowotworów najważniejszy jest

kontekst. W różnych rodzajach komórek i tkanek proces po aktywacji p53 może przebiegać różnie. Pokazał to w swoich badaniach Scott Lowe, kolejny z naukowców wykorzystujących modele myszy, którego poznaliśmy przy okazji rozważań o apoptozie. Obecnie jest on jedną z kluczowych postaci badających zjawisko senescencji komórek. Lowe odkrył, że chociaż komórki w stanie spoczynku rzeczywiście są odporne na apoptozę, to nie zawsze pozostają w tkance i stają się toksyczne. W niektórych tkankach komórki senescentne komunikują się z układem immunologicznym, który wysyła komórki żerne, czyli fagocyty, by je usunęły.

„W 2007 roku prowadziliśmy badanie, w ramach którego usunęliśmy z komórek p53 i uzyskaliśmy komórki nowotworowe. Kiedy następnie przywróciliśmy p53, komórki te przechodziły w stan spoczynku" – wyjaśnia Lowe. „Obserwowaliśmy to zarówno w wyhodowanych kulturach, jak i u zwierząt. Jednak o ile na szalkach Petriego komórki po prostu przestały być aktywne – nie dzieliły się, nie mnożyły, ale też i nie umierały – o tyle u zwierząt guzy zaczęły się cofać". Wprawiło to badaczy w konsternację. Byli pewni, że jeśli komórki nie będą się dzielić ani umierać, to guz pozostanie taki sam. Dlaczego zatem zaczął maleć? Przyglądając się temu mechanizmowi wnikliwiej, zauważyli, że białka rozsyłane przez komórki senescentne aktywowały reakcję układu odpornościowego, który usuwał je tak, jak eliminowałaby je apoptoza. W laboratorium mogli śledzić przebieg tego procesu. Kiedy umieścili na szalkach Petriego komórki w stanie spoczynku oraz fagocyty i umożliwili ich wzajemną komunikację – tworząc uproszczoną wersję procesu zachodzącego w żywych organizmach – zobaczyli, jak komórki żerne pochłaniają komórki senescentne.

Podobnie jak w przypadku odkrycia dotyczącego martwych komórek i apoptozy, okazało się to zaskakujące. Nie tego spodziewali się badacze. Lowe uznał jednak, że było to atrakcyjne intelektualnie. „Przez 15, 20 lat badaliśmy sposób, w jaki p53 wpływa na nadaktywne komórki. Właśnie zdaliśmy sobie sprawę, że p53 odgrywa znacznie większą rolę... Może także wysyłać sygnały, które mają wpływ na okoliczną tkankę".

Dziś nie wiadomo, dlaczego reakcja na stres w różnych warunkach prowadzi do odmiennych rezultatów. „Częściowo zależy to od tkanki. Komórki limfatyczne będą przede wszystkim ulegać apoptozie, a komórki łączne senescencji" – twierdzi Lowe. „Ale nie zawsze. Istnieją również inne czynniki, które wpływają na ten proces. Niektóre z nich już znamy, jednak nie na tyle, by stwierdzić, który jest decydujący... I nie chodzi nawet o to, że p53 uruchamia jedne geny, by indukować samobójstwo komórki, a inne, by prowadzić do senescencji, a o to raczej, w jaki sposób komórki interpretują geny aktywowane przez p53. To naprawdę niezwykle interesujące pytanie, o tak zwaną «biologię systemów» – sposób, w jaki komórka odbiera i integruje wiele równoczesnych sygnałów, by podjąć taką, a nie inną decyzję. Przez cały czas poszukujemy odpowiedzi na to pytanie".

Badacze zajmujący się rolą genu p53 w procesie starzenia są przekonani, że zarówno apoptoza, jak i senescencja są dla tego procesu niezwykle istotne. Senescencja z powodów opisanych powyżej, apoptoza zaś dlatego, że prowadzi do stopniowego wyczerpywania zapasu komórek macierzystych, wykorzystywanych przez organizm do naprawy uszkodzeń i utrzymania wszystkich funkcji. „Najprościej można by to zilustrować w taki sposób, że rodzimy się z ograniczoną liczbą komórek macierzystych" – wyjaśnia David Lane. „W przypadku

uszkodzenia DNA komórki, giną one bardzo szybko, co oznacza, że to właśnie one pozostają pod najściślejszą kontrolą p53. Jeśli wyznaczymy próg reakcji na stres na takim poziomie, że komórki macierzyste będą ginąć zbyt łatwo, nie zachorujemy na raka, ale szybko stracimy je wszystkie. Jeśli z kolei wyznaczymy próg reakcji na takim poziomie, że zabicie komórek macierzystych będzie trudne, będziemy mogli żyć dłużej, ale za to z większym ryzykiem zachorowania na raka".

Naukowcy badający procesy starzenia komórek mają swoją teorię, sformułowaną na podstawie zasad biologii ewolucyjnej, wyjaśniającą, dlaczego system stworzony, by chronić nas przed nowotworami i zachować przy życiu, miałby również napędzać mechanizm, który nieodwracalnie je skraca. Zasadniczo chodzi o to, że dla natury najważniejsze jest przedłużenie gatunku. Dlatego presja ewolucyjna, by wybierać i wzmacniać korzystne cechy – a eliminować te, które mogą być szkodliwe – działa tylko do i w trakcie okresu reprodukcyjnego. Później chodzi już tylko o to, by dożyć ostatnich dni; natura nas nie potrzebuje, gdy dobór naturalny już zadziałał.

W ogóle, starzenie się to zjawisko, które pojawiło się stosunkowo niedawno. Przez większość swoich dziejów ludzie nie umierali ze starości. Nie umieraliśmy na raka czy choroby układu krążenia, nie wiedzieliśmy, co to choroba Alzheimera. Ginęliśmy w walce, w wypadkach, zabijały nas drapieżniki, bakterie i głód. Dlatego właśnie przez tysiąclecia starość umykała uwadze ewolucji i doboru naturalnego. Dopiero dziś, kiedy w przeważającej części świata pokonaliśmy głód, chorobotwórcze drobnoustroje i drapieżniki, mechanizmy służące supresji nowotworów pokazują swoją drugą, niszczycielską twarz. Zrozumienie przyczyn procesu starzenia daje nam nadzieję

na przyszłość. „Ludzie zaczynają pytać: «Czy manipulując systemem możemy uzyskać to, co najlepsze z obu światów?»" – mówi David Lane. „Czy da się uwrażliwić gen na jakiś czas (by wyeliminować komórki nowotworowe), a później znowu go wyciszyć (by spowolnić starzenie)? Potrafię sobie wyobrazić naprawdę niezwykłe rezultaty, jakie będziemy mogli osiągnąć, gdy uda nam się w pełni opanować ten system".

ROZDZIAŁ 20

Rewolucja w leczeniu

...w którym czytamy o roli p53 w najnowocześniejszych terapiach genowych i medycynie spersonalizowanej, które rewolucjonizują obecnie proces leczenia nowotworów i, jak przewidują niektórzy, uwolnią dzisiejszych młodych ludzi od ryzyka śmierci z powodu raka.

* * *

[P53] sam, bez pomocy lekarzy zatrzymuje rozwój nowotworów miliony razy dziennie. Naukowcy nie muszą poprawiać tego wspaniałego systemu, który stworzyła natura. Muszą tylko zrozumieć, jak go wykorzystać.

Sharon Begley[42]

„Jeśli zajrzymy do wnętrza komórek rakowych – a dysponujemy dziś wspaniałą technologią, która pozwala zarejestrować wszystko, co się tam dzieje – i przyjrzymy się im z punktu widzenia ewolucji, okaże się, że nawet w ramach jednego typu nowotworu istnieje wiele rozmaitych podgatunków komórek, które rozwijały się w różny sposób" – mówi Gerard Evan. Jego uwagi o niezwykle małej częstotliwości występowania nowotworów otwierały tę książkę. „A oto my próbujemy

zniszczyć całego guza, utrzymując pacjenta przy życiu. To naprawdę trudne zadanie!".

Jednak Evan nie traci nadziei. Wręcz przeciwnie, w miarę gromadzenia kolejnych dowodów na to, że rak jest znacznie bardziej skomplikowaną chorobą, niż nam się wydaje – ewolucyjnym kotłem, z którego wyławiamy coraz to nowe rodzaje nowotworów – jego optymizm zdaje się rosnąć. Dlaczego? „Pozwól, że odwołam się do pewnej analogii" – mówi. „Kiedy nie znano jeszcze raka, ludzie narażeni byli na działanie okropnych chorób wywoływanych przez rozwijające się w ich ciałach komórki, atakujące i rozprzestrzeniające się w całym organizmie. Komórki te genetycznie są niezwykle zróżnicowane, wymieniają między sobą informacje i mnożą się jak szalone... Nazywamy je bakteriami, prawda?".

„Sto lat temu spojrzelibyśmy na te wszystkie choroby i powiedzielibyśmy: «O mój Boże, musimy znaleźć lekarstwo na każdą z nich – na gruźlicę płuc, kości, na to, na tamto...». Okazuje się jednak, że [bakterie] mają bardzo wiele cech wspólnych. Jeśli uderzyć w nie antybiotykiem, można wyleczyć, przynajmniej na pewien czas, wywołaną przez nie chorobę zakaźną. A prawda jest taka, że bakterie są dużo, ale to dużo bardziej genetycznie skomplikowane i zróżnicowane, odporne i pomysłowe niż komórki rakowe".

Dlatego, według Evana, najważniejszym zadaniem stojącym przed producentami leków jest wykrycie cechy wspólnej łączącej różne rodzaje raka – jakiejś mutacji o decydującym znaczeniu, bez której żaden nowotwór nie może przetrwać. Nie wszyscy zgadzają się z tym podejściem. Większość badaczy wciąż popiera koncepcję terapii celowych, dostosowanych do indywidualnych cech nowotworu i pacjenta. Jednak bez względu na punkt widzenia,

wszyscy zgodnie przyznają, że jednym z najważniejszych czynników, na których powinny się koncentrować badania, są geny supresorowe. Wysiłki naukowców pracujących w laboratoriach uniwersyteckich, a także ich kolegów zatrudnionych przez firmy farmaceutyczne, skupiają się również na odtwarzaniu lub wzmacnianiu naturalnych zdolności organizmu do identyfikowania i eliminowania zbuntowanych komórek.

Badacze wiążą ogromne nadzieje z terapiami opartymi na p53 i testują rozmaite nowatorskie koncepcje związane z wykorzystaniem tego genu. Jednak droga z laboratorium do łóżka pacjenta jest zwykle długa i pełna frustracji. Jak na ironię, w czasach, kiedy dynamiczny rozwój technologiczny coraz bardziej ułatwia opracowywanie nowych lekarstw i terapii, zasady i przepisy regulujące ten proces stają się coraz surowsze. Procedury prowadzące do zatwierdzania i rozpowszechniania nowych metod leczenia trwają często dłużej niż 10 lat. Bardzo wiele prototypów nigdy ich nie przechodzi. Tworzenie nowych leków jest z natury długim, bolesnym procesem prób i błędów, jednak ponoszone w jego trakcie „porażki" są zazwyczaj źródłem cennej wiedzy.

WIRUSY JAKO LEKARSTWA

Pierwszym człowiekiem, który spróbował zastosować u ludzi terapię opartą na p53 był Jack Roth, który w 1996 roku zwerbował do swoich badań dziewięciu pacjentów, u których zdiagnozowano nieoperacyjne nowotwory płuc. Ich guzy przestały reagować na konwencjonalne metody leczenia. Roth, dość przewrotnie, wykorzystał w swojej terapii pewne szkodliwe

właściwości wirusów – to, że mogą przeżyć i reprodukować się tylko wówczas, gdy zajmą żywe komórki w organizmie gospodarza i przejmą kontrolę nad mechanizmem replikacji. Przy pomocy rozwiązań inżynierii genetycznej Roth i jego zespół przekształcili zwykły wirus w narzędzie transportowania prawidłowych kopii genu p53 do komórek, w których gen przestał funkcjonować. Wszczepili ów zmodyfikowany wirus bezpośrednio do guzów i z zadowoleniem odkryli, że ich strategia działa – gen p53 został dostarczony do komórek rakowych, aktywował się i zaczął wytwarzać zdrowe białka, a pacjenci nie odczuli żadnych istotnych skutków ubocznych.

Jednakże wektor wirusowy, czyli środek transportu, nie zdołał ominąć zabezpieczeń układu odpornościowego, dlatego w następnych prototypach naukowcy pokryli wirus substancją zwiększającą jego szanse na zabicie komórek nowotworowych, nim on sam zostanie wyeliminowany przez komórki układu odpornościowego. Zmienili również samo narzędzie, zamiast retrowirusa wykorzystując tym razem adenowirus – czyli typ wirusa wywołujący przeziębienia i infekcje dróg oddechowych.

Obecnie terapie opracowane według tego wzoru testowane są na tysiącach pacjentów w ramach prób klinicznych prowadzonych w Stanach Zjednoczonych i Chinach. Okazały się one skuteczne, zwłaszcza jeśli stosuje się je w połączeniu z konwencjonalnymi chemio- i radioterapią. Wymagają one również starannego doboru pacjentów, ponieważ nie w każdych warunkach i nie we wszystkich przypadkach działają tak samo. Na przykład, metody te są zazwyczaj skuteczniejsze, jeśli wykorzystuje się je w komórkach nowotworowych, w których istniejący typ dziki p53 jest uwięziony w wyniku nadekspresji kontrolującego go białka Mdm2 lub kiedy poziom zmutowanych

białek p53 w komórkach nowotworowych jest na tyle niski, że nie może zdominować białka typu dzikiego, dostarczanego w ramach terapii genowej. (Pamiętacie zapewne, że w niektórych przypadkach, gdy u chorego występuje zarówno kopia typu dzikiego, jak i typu zmutowanego p53, zmutowane białko jest na tyle silne, że uniemożliwia funkcjonowanie typu dzikiego – pojawia się tak zwany efekt „mutacji dominującej negatywnej". Pacjent z tak silną mutacją nie będzie dobrym kandydatem do leczenia metodą transferu genów).

Pionierskie eksperymenty Rotha z połowy lat 90. ubiegłego wieku doprowadziły do stworzenia dwóch produktów rynkowych: Advexinu w Stanach Zjednoczonych i Gendicine w Chinach. Oba leki mogą być wstrzykiwane bezpośrednio do nowotworu lub też podawane dożylnie, podobnie jak preparaty wykorzystywane w chemioterapii. Leki testowano z różnym powodzeniem na rozmaitych typach nowotworów, między innymi wątroby, płuc, głowy i szyi. Okazało się, że mogą skutecznie zapobiegać przekształcaniu się łagodnych zmian w jamie ustnej w złośliwe nowotwory. W 2003 roku Gendicine został zaaprobowany przez chińskie władze do użytku klinicznego jako pierwszy na świecie lek terapii genowej. Obecnie w połączeniu z naświetlaniem, wykorzystywany jest w Chinach w leczeniu nowotworów głowy i szyi.

Zhang Shanwen, pracujący w Beijing Cancer Hospital, który przewodniczył testom klinicznym leku Gendicine, w 2007 roku po raz pierwszy przedstawił informacje na temat jego skuteczności. Na konferencji w Chinach zaprezentował dane zgromadzone podczas testów, w których uczestniczyło 26 pacjentów poddanych terapii genowej połączonej z naświetlaniem oraz 27 pacjentów z grupy kontrolnej, leczonych

jedynie metodą radioterapii. Spośród 26 pacjentów, którzy przeszli terapię łączoną, 17 żyło po pięciu latach od zakończenia terapii, a u 16 nie doszło nawet do nawrotu choroby. Z kolei spośród 27 pacjentów poddanych tylko radioterapii po pięciu latach żyło 14, a nowotwory nie pojawiły się ponownie u 10.

Trochę inaczej wygląda sytuacja Advexinu w Stanach Zjednoczonych, gdzie, pomimo oczywistych sukcesów terapeutycznych oraz faktu, że lek ma niemal identyczny skład jak Gendicine, ciągle nie udało się uzyskać pozwolenia na jego kliniczne wykorzystanie. Jest to tym trudniejsze, że Advexin, w związku ze swym ograniczonym zasięgiem, obejmującym przede wszystkim rzadko występujące nowotwory głowy, uznawany jest za „lek sierocy”[43]. Dotychczasowe starania o wprowadzenie go do klinik pochłonęły już ogromne kwoty. Kiedy w sierpniu 2008 roku amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (Food and Drug Administration, FDA) odmówiła zgody na wykorzystanie leku z powodu niewystarczających dowodów na jego skuteczność, ówczesny producent, Introgen Therapeutics Inc. z Houston, ogłosił bankructwo. Dziś właścicielem licencji na produkcję Advexinu jest mała spółka Vivante, powstała na gruzach Introgenu. Firma, przejęta w 2010 roku przez szwajcarskiego giganta, Lonzę, kontynuuje prace nad wprowadzeniem leku do obrotu w Stanach Zjednoczonych i Europie. Równocześnie chiński producent Gendicine stara się o uzyskanie zgody FDA na eksploatowanie swojego leku w Stanach Zjednoczonych. Próbuje też wejść do Indii.

Na początku lat 90. ubiegłego wieku Frank McCormick z Uniwersytetu Kalifornijskiego w San Francisco podjął próbę opracowania terapii, która wykorzystuje wirusy przeziębienia w nieco inny sposób. Zauważył, że komórki rakowe

i adenowirusy mają kilka ważnych cech wspólnych, między innymi taką, że do ich przeżycia potrzebna jest dezaktywacja p53. Była to cecha, którą mógł wykorzystać. Musiał ją jednak w pewien sposób zmodyfikować, aby upewnić się, że wirus zaatakuje i zabije tylko komórki rakowe, nie wywołując żadnej poważnej infekcji. McCormick usunął mechanizm wykorzystywany przez wirus do dezaktywacji p53. Oznaczało to, że wirus będzie mógł przeżyć tylko w tych komórkach, w których p53 już wcześniej przestał funkcjonować, czyli w komórkach rakowych. W nich będzie się mógł dzielić i rozwijać do czasu, aż te dosłownie pękną. Gdyby natomiast wirus zaatakował komórki z aktywnym p53 – czyli zdrowe komórki – oznaczałoby to jego natychmiastowe słabnięcie i śmierć. Był bowiem pozbawiony mechanizmu umożliwiającego dezaktywację genu supresorowego. Proces, w którym komórki rakowe zaatakowane przez wirusa pękają i rozpadają się, nazywamy onkolizą. Dodatkową zaletą metody opracowanej przez McCormicka było to, że cząsteczki wirusa wydostające się ze zniszczonej komórki rakowej po jej pęknięciu mogły infekować i atakować inne otaczające ją komórki nowotworowe, ale nie stanowiły zagrożenia dla zdrowych komórek.

W 1992 roku McCormick założył firmę Onyx Pharmaceuticals Inc. dla celów rozwijania jego pomysłu. Cztery lata później preparat terapeutyczny o nazwie ONYX-015 – jako pierwszy w świecie zmodyfikowany wirus onkolityczny – został dopuszczony do badań klinicznych. Początkowe testy, najpierw obejmujące tylko pacjentów cierpiących na nowotwór głowy i szyi, a później również na inne rodzaje raka, wyglądały bardzo obiecująco. Społeczność badaczy specjalizujących się terapiach

genowych chwyciła wiatr w żagle. A potem przyszedł druzgocący cios.

W 1999 roku osiemnastoletni Jesse Gelsinger, który zgłosił się na ochotnika do udziału w badaniach klinicznych prowadzonych na Uniwersytecie Pensylwanii, zmarł nagle w wyniku niewydolności wielonarządowej w przebiegu gwałtownej reakcji organizmu na podany środek. Testowanym produktem był zmodyfikowany adenowirus przenoszący gen, który miał korygować rzadkie, ale poważne zaburzenia pracy wątroby (prowadzące do odkładania się amoniaku w układzie krwionośnym), z którymi urodził się Gelsinger. Po śmierci młodego mężczyzny FDA czasowo zawiesiła testy kliniczne wszystkich preparatów genowych, a w konsekwencji poważnie zaostrzyła przepisy dotyczące bezpieczeństwa tych testów. Nastały bardzo trudne czasy dla firm farmaceutycznych i ostatecznie Onyx sprzedało licencję na wyrób ONYX-015 chińskiemu koncernowi Shenzen Si Biono Gene Technologies Ltd.

W tym samym czasie również inne chińskie przedsiębiorstwa prowadziły testy leków onkolitycznych, bardzo podobnych do ONYX-015. Jednym z nich był Oncorine, produkowany przez Shanghay Sunway Biotech Ltd. Był to pierwszy zmodyfikowany wirus onkolityczny na świecie, który trafił do gabinetów lekarskich po uzyskaniu w 2005 roku aprobaty chińskich władz. Wydarzenie to poprawiło nieco nastroje wśród zniechęconego niepowodzeniami środowiska zwolenników terapii genowych. Dziś Oncorine stosowany jest w Chinach w połączeniu z chemioterapią (jako lek alternatywny do Gendicine) w leczeniu nowotworów głowy oraz szyi, a dane z dotychczasowych prób sugerują, że jest to połączenie prawie dwa razy skuteczniejsze niż sama chemioterapia. Celem chińskich przedsiębiorstw jest teraz

uzyskanie zgody na wykorzystanie Oncorine lub ONYX-015 w Europie i Stanach Zjednoczonych.

Na razie najważniejszym wyzwaniem dla naukowców pracujących nad udoskonaleniem terapii genowych jest przygotowanie wirusowych nośników w taki sposób, by nie zostały one wykryte i zniszczone przez układ odpornościowy pacjenta przed dowiezieniem „ładunku" do komórek rakowych. Innym niezwykle istotnym problemem jest opracowanie sposobu na dostarczenie leku do rozsianych po organizmie przerzutów, ponieważ najczęściej to właśnie guzy wtórne są przyczyną śmierci pacjentów.

DROBNE CZĄSTECZKI URUCHAMIAJĄ REAKCJĘ NA STRES

Naukowcy badają również możliwość wykorzystania innych rodzajów terapii, dla których punktem wyjścia jest fakt, że w wielu nowotworach gen p53 nie ulega dezaktywacji w wyniku mutacji, lecz na skutek działania jakiegoś innego mechanizmu. Na przykład, jeśli chodzi o raka szyjki macicy, około 90 proc. jego przypadków jest spowodowanych działaniem wirusa brodawczaka (*human papilloma virus*, HPV) przenoszonego przez kontakty seksualne, który może również wywoływać brodawki [wirusowe] na narządach płciowych. W 1990 roku badacze z amerykańskiego Narodowego Instytutu ds. Raka (NCI) odkryli, że jeden z genów wirusa wytwarza w zainfekowanych komórkach białko E6, które całkowicie blokuje działanie p53. Jak tłumaczy Karen Vousden z NCI: „Białko E6 łączy się z p53 oraz kilkoma innymi białkami. W rezultacie gen p53 bardzo szybko ulega degradacji – po prostu

rozpada się na drobne kawałeczki – i nie jest w stanie wyprodukować żadnego funkcjonującego białka. Wygląda to tak, jakby w komórce w ogóle nie było p53". W takiej sytuacji najskuteczniejszym rozwiązaniem jest profilaktyka. Jest ona już dziś możliwa dzięki szczepionce wprowadzonej na rynek w 2006 roku.

Ale sposób działania wirusa HPV jest nietypowy. Znacznie częściej czynnikiem blokującym właściwe funkcjonowanie normalnego genu p53 są nieprawidłowości pojawiające się gdzie indziej w procesie supresji nowotworów. Jednym z takich czynników może być na przykład nadmierna aktywność genu kontrolującego p53, czyli Mdm2. Jak zapewnie pamiętacie z Rozdziału 13, jest to gen aktywowany przez p53, wytwarzający białko, które z kolei wiąże się z p53 i przeznacza je do zniszczenia. Ten taniec śmierci p53 z Mdm2 przebiega w powtarzającym się cyklu, trwającym od 5 do 20 minut. Mdm2 sprawia, że niezwykle potężny p53 – zdolny zabijać komórki lub powstrzymywać ich podział – sam pozostaje pod kontrolą. Gdy naukowcy poznali ów mechanizm, zrozumieli, że jeśli uda im się uwolnić p53 z więzów Mdm2, na przykład blokując interakcję między oboma białkami, być może będą w stanie reaktywować działanie p53 w komórkach, w których jest ono nadmiernie stłumione – czyli w komórkach rakowych. Uważali, że w takich komórkach p53 jest jak gotowa do wystrzału nabita strzelba, w której zaciął się cyngiel. Wyzwanie polegało na tym, by znaleźć coś, co odblokuje spust.

Pierwszym, któremu się to udało, był David Lane z centrum badawczego w Dundee. W 1990 roku przy użyciu drobniutkiej cząsteczki zatkał miejsce, w którym Mdm2 łączy się z p53. Było to zadanie skomplikowane ze względu na nietypowe kształty białek

w ogóle i wyjątkową elastyczność p53 w szczególności – twierdzi Lane w trakcie naszej rozmowy. „Czy było to tak trudne jak poszukiwania leków antyretrowirusowych na HIV?" – pytam. „HIV to bardzo pouczający przykład" – odpowiada Lane. „Kiedy zaczynałem jako młody mikrobiolog, starsi koledzy mówili mi, że nikt nigdy nie wymyśli lekarstwa na wirusy, że to niemożliwe, ponieważ wirus jest silnie połączony z gospodarzem i korzysta z jego mechanizmów biologicznych. Mówili również, że nigdy nie powstaną leki powstrzymujące interakcje między białkami, a układ odpornościowy nigdy nie będzie pomagał w zwalczaniu komórek rakowych. Tak więc, różni ludzie mówią różne rzeczy z całkowitą pewnością... I oczywiście zawsze się mylą!" – śmieje się.

Obecnie koncerny farmaceutyczne pracują nad co najmniej kilkoma lekami zakłócającymi interakcję między p53 i Mdm2. Najstarszym i najbardziej znanym z nich jest Nutlina, produkowana od 2004 roku przez farmaceutycznego giganta Hoffmann-La Roche (nazwa leku pochodzi od nazwy instytutu badawczego firmy zlokalizowanego w Nutley w stanie New Jersey). Jednak początkowy entuzjazm, wywołany udanymi próbami, bardzo szybko ustąpił miejsca niepewności i obawom. Pierwsze doniesienia na temat Nutliny dotyczyły udanych eksperymentów na komórkach i tkankach wyhodowanych na szalkach Petriego. Niestety, późniejsze doświadczenie na myszach z 2006 roku, w którym rozdzielono p53 i białko kontrolne, przyniosło katastrofalne wyniki, które dały do myślenia wszystkim zaangażowanym w rozwój tej metody.

Po wyhodowaniu myszy pozbawionej genu wytwarzającego białko Mdm2 kontrolujące p53, naukowcy w laboratorium Gerarda Evana podali jej środek, który miał aktywizować

działanie supresora nowotworowego. Pozbawione kontroli białko p53 natychmiast weszło na najwyższe obroty we wszystkich komórkach ciała zwierzęcia i wywołało masową apoptozę – ostatecznie mysz dosłownie się roztopiła. Tak naprawdę mysz pozbawiona Mdm2 nie była modelem odpowiednim dla oceny skuteczności Nutliny i innych podobnych do niej leków, stworzonych w taki sposób, by tylko na krótko rozdzielać p53 i kontrolujące je białko. Doświadczenie zrodziło jednak pytania o to, w jaki sposób ograniczyć destrukcyjne oddziaływanie p53 wyłącznie do komórek nowotworowych. Naukowcy i producenci pracowali bardzo ciężko, by rozwiązać ten problem. Współczesne wersje leku wykazują bardzo niewielką aktywność genu poza docelowymi komórkami.

Podczas badań laboratoryjnych Nutlina hamowała podział komórek pobranych z rozmaitych typów nowotworów, w tym jelita grubego, płuc, piersi, skóry oraz krwi. Podobnie zachowywała się podczas badań na modelach zwierzęcych. Ale, jak mówi Lane, który współpracuje z zespołem naukowców z Roche doskonalących Nutlinę, rezultaty były zaskakująco niespójne. Na przykład podczas niedawnych doświadczeń z ostrą białaczką szpikową (AML), członkowie zespołu badali w laboratorium komórki nowotworowe pobrane od wielu różnych pacjentów. Zauważyli, że o ile niska dawka leku wystarczyła, by we wszystkich komórkach doszło do zahamowania podziałów, a niektóre skierowane zostały na drogę śmierci, o tyle indukowanie apoptozy u pewnych komórek wymagało dawek leku 10- albo nawet 20-krotnie większych. Dlaczego tak się działo? Nadal nikt nie potrafi jednoznacznie odpowiedzieć na to pytanie, choć pojawiła się dość racjonalna hipoteza – że oto równowaga pomiędzy białkami

indukującymi śmierć komórki, a tymi, które jej zapobiegają, które pozostają aktywne w trakcie całej terapii, może wpływać na ich wrażliwość. Dlatego, jak twierdzi Lane, dopiero kiedy twórcy leków w pełni poznają i zrozumieją zasady oraz przebieg procesu, będą mogli dokładnie określić, którzy pacjenci mogą być leczeni Nutliną i jakie dawki należy podawać, by wywołać pożądany rezultat, czyli śmierć komórek rakowych.

Jednocześnie badacze analizują skuteczność Nutliny w połączeniu z konwencjonalnymi radio- i chemioterapią. W toku dotychczasowych doświadczeń i testów odkryli, że w przypadku wielu typów nowotworów połączenie takie jest znacznie skuteczniejsze niż zastosowanie samej Nutliny lub samej terapii konwencjonalnej. Jednym z celów takiego połączenia jest wykorzystanie efektu synergii tych czynników po to, by móc zredukować dawkę leków konwencjonalnych – a tym samym ograniczyć ich bolesne skutki uboczne – nie zmniejszając przy tym skuteczności terapii. To szczególnie paląca potrzeba w odniesieniu do przypadku mięsaków, które są jednym z typów nowotworów najczęściej pojawiających się u dzieci. I w tej dziedzinie Nutlina przynosi obiecujące wyniku. W 2011 roku naukowcy poszukujący metod niszczenia mięsaka odkryli podczas doświadczeń, że jeśli połączą konwencjonalne leki z Nutliną, mogą ich użyć dziesięciokrotnie mniej i będą osiągać takie same albo nawet lepsze rezultaty niż przypadku samej chemioterapii.

Zerwanie więzów łączących p53 z kontrolującym go Mdm2 stanowi tak atrakcyjną opcję dla producentów leków, że w rywalizację o stworzenie i wprowadzenie na rynek tego typu preparatów włączyły się największe koncerny farmaceutyczne, jak Merck czy Sanofi, a także wiele mniejszych firm. Jednak zanim osiągną swój cel, muszą znaleźć jednoznaczne

odpowiedzi na kilka podstawowych pytań: w jaki sposób leki te mogą wpływać na zdrowe komórki i jak mocno toksyczne mogą okazać się dla organizmu?

Wśród naukowców tworzących leki tego typu jest Galina Selivanova z Instytutu Karolinska w Sztokholmie. Lek, na którym pracuje Selivanova, ma działać podobnie i nazywa się RITA. Badaczka podkreśla, że sama obecność p53 nie wystarczy, by wywołać śmierć komórki. Aby gen supresorowy się uaktywnił, potrzebny jest jasny sygnał, że komórka jest poddana stresowi – a takie sygnały są prawdopodobnie najmocniejsze w komórkach nowotworowych. „Mam nadzieję, że jeśli uda się stworzyć niezbyt mocny inhibitor[44] Mdm2, czyli taki, który pozwoli na uwolnienie części p53, to działanie supresora nie wywoła drastycznych skutków w zdrowych komórkach. Ale w komórkach rakowych, w których jest mnóstwo silnych sygnałów, p53 będzie zabijał".

ODWRÓCIĆ MUTACJĘ

Kiedy Selivanova wyjeżdżała z Rosji w 1992 roku z doktoratem z genetyki zdobytym na Uniwersytecie Moskiewskim, zamierzała spędzić za granicą jedynie trzy letnie miesiące, gromadząc doświadczenie w zakresie badania organizmów wyższych, które mogłaby wykorzystać później w pracy na macierzystej uczelni. Jednak po przyjeździe do Szwecji dołączyła do zespołu Klasa Wimana w Instytucie Karolinska, odkryła p53 i już nie wróciła. „To było bardzo ekscytujące od samego początku" – mówi mi podczas naszego spotkania w Toronto, w trakcie konferencji poświęconej mutacjom p53. „P53 jest niewiarygodnie ciekawy. Wszystko, co robisz, rodzi nowe pytania i otwiera nowe

możliwości". Selivanova dołączyła do społeczności badaczy p53 w okresie, kiedy naukowcy zaczynali się poważnie zastanawiać nad przełożeniem wiedzy teoretycznej na działania praktyczne – czyli nad tym, w jaki sposób można wykorzystać ogromną wiedzę na temat genu p53, by udoskonalić metody leczenia pacjentów chorych na raka. Dla Selivanovej ta kwestia miała szczególne znaczenie, bowiem niewiele wcześniej jej matka zmarła na nowotwór mózgu. Tym bardziej zaangażowała się więc w poszukiwania.

Poza prowadzeniem własnych badań nad lekiem RITA, Selivanova pracowała wspólnie z Wimanem nad stworzeniem innego preparatu, znanego jako PRIMA-1, który wydaje się obecnie jedną z najciekawszych propozycji terapii opartych na p53. Lek ma działać w komórkach nowotworowych, w których p53 uległ mutacji i wytwarzane przez niego białko funkcjonuje nieprawidłowo, ponieważ nie wiąże się z DNA i nie aktywuje innych genów. PRIMA-1 może przywrócić zmutowany p53 do normalnej postaci. Jego wynalezienie było w dużej mierze dziełem przypadku. W 1995 roku naukowcy badali drobne fragmenty białka, nazywane peptydami, szukając takich, które mogłyby regulować działanie p53. Podczas tych obserwacji zaintrygował ich szczególnie jeden z peptydów, który mógł aktywować zarówno typ dziki, jak i zmutowane p53.

Był to jasny sygnał, że „odwrócenie" mutacji p53 jest możliwe. Selivanova była tym bardzo podekscytowana. „To było fantastyczne" – wspomina z uśmiechem. „Od razu chciałam zacząć leczyć nowotwory – przynajmniej u myszy!". Niestety, okazało się, że peptyd ten nie nadaje się do wykorzystania jako lek. W organizmach żywych te skrawki białka nie były w stanie dostać się do wnętrza komórki, szybko się rozkładały i były

utylizowane. Potrzebny był zatem jakiś związek chemiczny, mała cząsteczka, która mogłaby wykonywać to samo zadanie.

Wspólnie z Wimanem i młodym doktorem, Vladimirem Bykovem Selivanova przeanalizowała tysiące związków z katalogu potencjalnych kandydatów, dostarczonego przez amerykański Narodowy Instytut ds. Raka. W 1999 roku troje naukowców odkryło taką cząsteczkę. Nazwano ją PRIMA, co jest skrótem od *p53 reactivation and induction of massive apoptosis* (pol. reaktywacja p53 i indukcja masowej apoptozy), a poza tym może się kojarzyć z najwyższą jakością. Podczas doświadczeń z tą cząsteczką badacze, ku swej satysfakcji, odkryli, że działa ona skutecznie w przypadku wielu różnych rodzajów mutacji p53, co oznacza, że może być potencjalnie przydatna w leczeniu różnych typów nowotworów. Niedługo później opublikowali wyniki swoich badań. Wiman, wysoki, spokojny Szwed opowiada mi podczas naszego spotkania w Sztokholmie: „PRIMA wzbudziła ogromne zainteresowanie mediów. Występowałem w telewizji, gazetach i pismach na całym świecie, ponieważ pomysł, że taka malutka cząsteczka może sprawić, iż komórki rakowe zaczną masowo popełniać samobójstwo, bardzo przemawia do wyobraźni".

Jak zatem działa PRIMA-1? Wiman i Bykov ku własnemu zdziwieniu odkryli, że zarówno PRIMA-1, jak i inny, bardzo podobny związek, PRIMA-1 MET, zostają przekształcone w inny związek, który wiąże się bardzo ściśle z białkiem p53, a następnie zwija je na nowo. „Było to bardzo ważne i ciekawe odkrycie, ponieważ pozwoliło nam zrozumieć, w jaki sposób te związki reaktywują zmutowane p53" – mówi Wiman.

Wiman, Seliovanowa i Bykow założyli małą firmę biotechnologiczną z udziałem Instytutu Karolinska,

by przygotować PRIMA-1 MET do wprowadzenia na rynek. Okazało się, że w związku z tym muszą się bardzo wiele nauczyć. „Jesteś naukowcem, a musisz pracować w biznesie – to całkiem inna kultura" – mówi Wiman. „Nagle zjawiają się ci wszyscy ludzie w garniturach, zaczynają się spotkania zarządu i rozmowy o pieniądzach... A jednocześnie stale musisz działać z lekarzami. To trzy różne światy, które na każdym etapie muszą współpracować. Kiedy zaczynaliśmy, nie mieliśmy pojęcia, w co się pakujemy".

Firmie udało się przeprowadzić pierwszą fazę prób klinicznych PRIMA-1 MET, w której 22 pacjentom z nowotworami prostaty i krwi podawano lek przez krótki okres. Celem pierwszej fazy badań było przetestowanie tolerancji pacjentów na potencjalny nowy lek, a także sprawdzenie, w jaki sposób rozprzestrzenia się on w organizmie i jak długo się w nim utrzymuje. Rezultaty, opublikowane w 2012 roku, były obiecujące. Testy wykazały, że PRIMA-1 MET nie jest toksyczny, a skutki uboczne są bardzo łagodne – zaliczają się do nich zawroty głowy i ogólne zmęczenie.

Kolejnym krokiem będzie faza druga testów klinicznych. Mają one pokazać, czy lek w ludzkim organizmie działa tak samo jak w warunkach laboratoryjnych. Badacze ze Sztokholmu i ich firma mają nadzieję, że uda im się przetestować u pacjentów PRIMA-1 MET w połączeniu z konwencjonalną chemioterapią. Chcą w ten sposób wykorzystać efekt synergii: PRIMA-1 MET ma przywracać zmutowanemu p53 jego normalny kształt i funkcje, a drugi lek ma w tym samym czasie uszkadzać DNA komórek nowotworowych, tak by wywołać sygnałowanie o stresie i indukować ich apoptozę. Tu jednak pojawiają się prawdziwe przeszkody. Według Wimana, przeprowadzenie drugiej fazy testów leku będzie prawdopodobnie kosztować miliony euro.

Mała firma biotechnologiczna musi więc znaleźć silnego partnera, który zechce zainwestować w badania.

Pewien duński lekarz, który widział efekty działania PRIMA-1 MET na nowotwór płuc w laboratorium i u myszy, jest tak zainteresowany nowym lekiem, że zgłosił chęć natychmiastowego rozpoczęcia testów. Również MD Anderson Center jest gotowe, by przeprowadzić drugą fazę badań klinicznych PRIMA-1 MET z udziałem swoich pacjentów. Niestety, problem stanowi znalezienie na to wszystko funduszy. Tymczasem wielkie koncerny farmaceutyczne wydają się na razie niezbyt zainteresowane drobnymi cząsteczkami, które przywracają normalny kształt i funkcje zmutowanemu p53, ponieważ ciągle nie wiadomo do końca, w jaki sposób się to odbywa.

INTELIGENTNA TERAPIA

Problemem, który szczególnie utrudnia leczenie nowotworów, jest odporność na leki. Wyjątkowa niestabilność komórek rakowych i błyskawiczne tempo, z jakim ulegają kolejnym mutacjom, oznaczają, że są one w stanie w bardzo krótkim czasie znaleźć sposób na ominięcie zastosowanego środka, bez względu na jego skład i moc. Komórki, które przeżyją pierwsze uderzenie leku, dają początek nowej grupie równie silnych klonów, z których później rozwijają się bardzo odporne guzy. Chcąc zwiększyć szanse powodzenia terapii, onkolodzy zazwyczaj łączą różne metody leczenia – podając pacjentom koktajl lekowy albo łącząc leki z radioterapią. Przy takiej strategii komórki nowotworowe, które oparły się jednemu rodzajowi leczenia, powinny ulec drugiemu.

Inną metodą testowaną obecnie przez naukowców jest wykorzystanie kombinacji leków w ramach nowej, opartej na p53 terapii nazywanej cykloterapią. Jednym z największych mankamentów konwencjonalnej chemioterapii, która jest „cytotoksyczna" (czyli trująca dla komórek) i uderza w szybko dzielące się komórki, jest jej masowy zasięg. Komórki nowotworowe dzielą się bardzo szybko, jednak podobną cechę mają komórki mieszków włosowych, wyściółki jelit i szpiku kostnego – a zatem i one doznają ogromnych szkód w trakcie chemioterapii. A przy tym utrata włosów, mdłości, biegunki, anemia oraz obniżenie odporności to coś więcej niż tylko nieprzyjemne dla pacjenta skutki uboczne. W rzeczywistości stanowią one śmiertelne zagrożenie i zmuszają onkologów do ograniczania dawek leków, które podają pacjentom w walce z nowotworem.

Dlatego w ramach cykloterapii jeden z leków podawany jest po to, by „ochraniać" zdrowe komórki przed chemioterapią. Lek ten czasowo wstrzymuje podział zdrowych komórek, podczas gdy inny, podawany równocześnie, środek cytotoksyczny niszczy komórki nowotworowe (które nie przestają się dzielić). W teorii działania polegające na ochronie zdrowych komórek mają pozwolić lekarzom na zwiększanie dawek cytotoksycznych leków i maksymalizowanie w ten sposób szans na pokonanie nowotworu. Nawet jeśli cykloterapia nie zawsze umożliwi całkowite zniszczenie guza, to w każdym razie nieco złagodzi dokuczliwe skutki uboczne chemioterapii, ponieważ zmniejszy jej siłę oddziaływania na komórki włosów, jelit czy szpiku.

Wyniki testów laboratoryjnych pokazują, że obecnie najbardziej obiecującym lekiem spośród grupy podobnych preparatów, które można by wykorzystać do ochrony zdrowych

komórek, jest Nutlina. Cykloterapia jest ciągle w fazie eksperymentów i minie jeszcze przynajmniej kilka lat, zanim wejdzie w fazę testów klinicznych. Naukowcy muszą najpierw określić, które kombinacje leków są najskuteczniejsze, w jakich dawkach i w jakich typach nowotworów. Zatrzymanie cyklu komórkowego musi być odpowiednio długie, ale odwracalne. Zbyt wysoka dawka preparatu może na przykład doprowadzić do senescencji komórek, a zbyt niska może sprawić, że okres zatrzymania będzie za krótki i komórki zostaną zniszczone przez leki cytotoksyczne. Nadal nie wiadomo również, jak ten proces przebiega w organizmach żywych – do 2012 roku opublikowano tylko jeden raport opisujący przebieg i wyniki doświadczeń na myszach. Jednak jednym z najważniejszych ograniczeń utrudniających wprowadzenie cykloterapii, jest brak zgody na dopuszczenie do obrotu Nutliny czy któregokolwiek innego z potencjalnych „obrońców" zdrowych komórek.

NOWE SPOJRZENIE NA STARE TERAPIE

Jak widać, prace nad całkowicie nowymi terapiami opartymi na p53 przebiegają we frustrująco wolnym tempie. Na szczęście już sama świadomość znaczenia tego genu oraz zrozumienie mechanizmu jego funkcjonowania zaczynają mieć wpływ na metody leczenia nowotworów – umożliwiają naukowcom i lekarzom podejmowanie bardziej racjonalnych decyzji dotyczących wykorzystania konwencjonalnej radio- i chemioterapii.

Historia chemioterapii jest barwna i zaczęła się dość przypadkowo. Początki tej metody sięgają I wojny światowej i gazu musztardowego, wykorzystywanego z niszczycielskim

skutkiem przez Niemców. Stosowanie broni chemicznej zostało po wojnie zakazane na mocy protokołu genewskiego z 1925 roku. Zakaz nie dotyczył jednak posiadania takiej broni i Amerykanie kontynuowali jej produkcję. W grudniu 1943 roku amerykański statek handlowy SS Harvey, który potajemnie przewoził bomby wypełnione gazem musztardowym na front śródziemnomorski, został zatopiony podczas niemieckiego nalotu na port Bari w południowych Włoszech. W efekcie nad miastem przez pewien czas unosiła się chmura trującego gazu. Nikt nie wie, ilu cywilów ucierpiało w wyniku tego zdarzenia, ale ponad 600 żołnierzy trafiło do szpitala, a 83 zmarło. Podczas sekcji zwłok patolodzy znaleźli dowody na to, że zdrowe, szybko dzielące się komórki szpiku kostnego i tkanek limfatycznych uległy zniszczeniu. Na podstawie tych obserwacji wyciągnęli wniosek, że być może wykorzystując jakiś podobny środek, udałoby się skutecznie zaatakować komórki rakowe, które także dzielą się w przyspieszonym tempie.

Niedługo później naukowcy przeprowadzali doświadczenia z gazem musztardowym u myszy. Zachęceni wynikami, rozpoczęli badania na ludziach. Pierwszym badanym był pacjent cierpiący na chłoniaka – nowotwór tkanki limfatycznej. Początkowe wyniki był bardzo zadowalające. Wkrótce po podaniu preparatu lekarze zauważyli, że jego guz radykalnie się skurczył. Choć efekt okazał się krótkotrwały, to i tak poruszył całe środowisko. Oto nareszcie pojawił się jakiś nowy sposób leczenia raka. Wcześniej jedyną metodą pozbycia się guzów były zabiegi chirurgiczne, po których i tak długoterminowe szanse przeżycia pacjentów były minimalne.

W ciągu dziesięcioleci, które minęły od tamtej pory, stworzono wiele rozmaitych leków cytotoksycznych – takich, które działają,

zabijając komórki. Jednak o ile chemioterapia jest bardzo skuteczna w przypadku niektórych typów nowotworów, o tyle w innych nie przynosi żadnych efektów, a w jeszcze innych działa przez jakiś czas, a potem przestaje. Dlaczego reakcje są tak zróżnicowane? Naukowcy nie znali odpowiedzi na to pytanie do czasu, kiedy wyniki badań nad p53 zaczęły im podpowiadać różne możliwe wyjaśnienia. Dziś wiemy, że działanie chemio- i radioterapii nie polega na bezpośrednim atakowaniu i zabijaniu komórek nowotworowych, jak przypuszczano wcześniej, lecz przebiega w nieco subtelniejszy sposób. Zazwyczaj terapie te działają, powodując uszkodzenia DNA komórek rakowych, a przez to wywołując ich samobójstwo – co jest normalną, uruchamianą przez p53 reakcją komórki na stres.

Jednym z pierwszych naukowców, który dostrzegł kluczową rolę genów supresorowych w terapiach konwencjonalnych był Scott Lowe. Poznaliśmy go w Rozdziale 12, gdy opracowywał kolejne modele myszy i dokonywał przełomowych odkryć na temat związku p53 ze zjawiskiem apoptozy. W skrócie, Lowe poddał naświetlaniu niezwykle wrażliwy gruczoł, jakim jest grasica i odkrył, że komórki ze zdrowym, normalnie funkcjonującym genem p53 bardzo szybko obumierały, podczas gdy komórki, w których p53 był zmutowany, oparły się naświetlaniu i przeżyły. Po potwierdzeniu roli p53 w apoptozie wywołanej naświetlaniem, Lowe zaczął się zastanawiać, czy działanie p53 może odpowiadać za ogólne skutki naświetlania i skutki działania leków cytotoksycznych w terapiach antynowotworowych. Choć to prosty pomysł – i z dzisiejszej perspektywy sprawa oczywista – w tamtym okresie był naprawdę rewolucyjny.

„Sformułowaliśmy wówczas hipotezę, że jeśli p53 jest zmutowany, to prawdopodobieństwo, że chemioterapia będzie skuteczna, znacząco spada" – wyjaśnia Lowe. „I to się sprawdza w przypadku białaczek oraz chłoniaków. Jednak dziś, po 17 latach różnych badań i doświadczeń, wiemy, że sprawa jest bardziej skomplikowana".

W komórkach białaczki i chłoniaka, p53 jest niemal zawsze normalny a, jak można by przypuszczać, nowotwory te są bardzo wrażliwe na chemio- i radioterapię. Za to w przypadku guzów litych (nowotworów narządów, a nie krwi) reakcja jest znacznie trudniejsza do przewidzenia, czasem wręcz odwrotna od oczekiwanej. W niektórych typach nowotworów komórki ze zmutowanym p53 reagują na działanie leków cytotoksycznych mocniej niż komórki z normalnym p53. Tak dzieje się na przykład w przypadku glejaka, agresywnego nowotworu mózgu. Dlaczego?

Według jednego z wyjaśnień, w takich przypadkach komórki ze zmutowanym p53 są rzeczywiście zabijane bezpośrednio, tak jak to sobie wyobrażali onkolodzy. Ich DNA zostaje poważnie uszkodzone i nie da się go naprawić, ponieważ p53 nie funkcjonuje. Z tego samego powodu nie można również zatrzymać procesu podziału komórek. Dlatego chaotycznie kontynuują one cykl i na koniec ulegają tak zwanej „katastrofie mitotycznej" – ogólnej awarii mechanizmu replikacji. W takim scenariuszu onkolodzy muszą wiedzieć, jaki jest status genu p53 w komórkach w danym typie nowotworu, a w związku z tym, jak zareaguje on na terapię. Jednak w rzeczywistości, sytuacja może być bardziej złożona.

W niektórych przypadkach zastosowanie radio- lub chemioterapii u pacjentów z normalnym p53 może tak naprawdę pogorszyć sytuację. Jak wiemy, śmierć komórek nie jest jedynym

rodzajem reakcji na uszkodzenie DNA. Może się zdarzyć, że p53 zatrzyma wzrost komórek w połowie cyklu i wyśle zespół naprawczy, by usunął uszkodzenie, a potem ponownie uruchomił replikację. Może też skazać komórki na senescencję – stałe zatrzymanie cyklu [komórkowego], co, jak wiemy z rozdziału na temat starzenia, może ostatecznie doprowadzić do rozwoju raka w komórkach sąsiadujących. W ten sposób komórki rakowe, które nie zostały zniszczone w trakcie radio- lub chemioterapii mogą stać się zalążkiem kolejnych nowotworów. I często bywa tak, że te odbudowane nowotwory są silniejsze i bardziej agresywne właśnie dlatego, że powstały z komórek, które przetrwały toksyczny atak i się uodporniły.

Hipoteza ta wydaje się rozsądna, ale pozostaje jedynie hipotezą, ponieważ brakuje wciąż wiarygodnych danych, które mogłyby ją potwierdzić. Jedna z przyczyn tego zamieszania leży w ogromnym zróżnicowaniu metod wykorzystywanych w badaniach nad p53. Trudno przez to porównać wyniki rozmaitych doświadczeń. Jak mówi Pierre Hainaut: „W układach doświadczalnych można uzyskać wszystkie możliwe wyniki. Zawsze można sprawić, by model zachowywał się w określony sposób, tak jak chce tego badacz. W prawdziwym życiu jest zupełnie inaczej...". Hainaut sadza mnie przed komputerem w swoim gabinecie w Lyonie i otwiera artykuł, który przekazuje właśnie do publikacji. Jest to analiza całej serii prób klinicznych testujących efekty zastosowania cisplatyny, chemioterapii pierwszego rzutu w leczeniu nowotworów płuc. Ogólnie, skutki zastosowania leku były niewielkie, ale Hainaut i jego współpracownicy chcieli sprawdzić, czy status p53 w komórkach poszczególnych pacjentów miał jakikolwiek wpływ na wynik leczenia. Przygotowując analizę, zgromadzili największy zestaw

tego typu danych. Zawarte w nim były informacje na temat wyników leczenia i statusu p53 w komórkach nowotworowych zebrane w trakcie czterech serii prób klinicznych przeprowadzonych w Kanadzie, Stanach Zjednoczonych i Europie, obejmujących 1200 pacjentów.

Zgodnie z przewidywaniami, badacze ustalili, że pacjenci, u których w komórkach rakowych występował normalny p53, zareagowali na terapię znacznie lepiej od tych, którzy mieli w komórkach zmutowany gen. Zaskoczyło ich za to, że stan pacjentów, u których wystąpiły pewne szczególne rodzaje mutacji, pogorszył się drastycznie w wyniku leczenia cisplatyną. Ich nowotwory rozprzestrzeniły się gwałtownie i wielu z nich prawdopodobnie zmarło szybciej, niż gdyby w ogóle nie podjęli tej terapii. Gdy rozmawiam z Hainautem, nie jest on do końca pewien, czy przyczyną śmierci w tych przypadkach były rzeczywiście przerzuty – czekał na szczegółowe informacje od statystyka. Takie jednak miał przeczucie.

Bez względu na to, co było przyczyną śmierci [tych chorych], znajomość statusu p53 w komórkach nowotworowych pacjentów cierpiących na raka pomoże podejmować decyzje, którzy z nich mogą być leczeni cisplatyną, a którzy nie. „Nie radzimy sobie za dobrze z rakiem płuc" – przyznaje Hainaut, przewijając tekst artykułu na ekranie. „Na świecie choruje na niego obecnie około 1,5 mln ludzi. Około 500 tys. z nich leczonych jest co roku cisplatyną. Leczeni są «na ślepo», ponieważ nikt nie przeprowadza u nich wcześniej badań statusu p53. Takie badania z pewnością mogłyby poprawić wyniki terapii. Myślę, że naprawdę warto byłoby je przeprowadzać... Tak wynika z naszej analizy".

Sytuacja opisywana przez Hainauta dotyczyła wprawdzie leczenia cisplatyną nowotworów płuc, w których dodatkowo

pojawiały się określone mutacje p53, ale ilustruje ona znakomicie szersze zjawisko. Wszystkie odkrycia naukowców związane z genem p53 i jego rolą w terapiach konwencjonalnych pozwalają dziś lekarzom podejmować bardziej racjonalne decyzje dotyczące metod leczenia. Te decyzje będą jeszcze lepsze, jeśli badanie statusu p53 będzie częścią szerszej analizy genetycznej nowotworu, ponieważ oprócz genu supresorowego także różne inne czynniki mogą mieć wpływ na przebieg i wynik terapii. Obecnie tego typu badania są rzadkością w poradniach onkologicznych, ale sytuacja szybko się zmienia. Kiedy pełne sekwencjonowanie genomu stanie się jeszcze łatwiejsze, szybsze i tańsze, a nowe terapie genowe, dostosowane do specyficznych cech zarówno nowotworu, jak i pacjenta, zaczną być stosowane w warunkach klinicznych, również badania genetyczne staną się stałym elementem procesu diagnostyki i leczenia. Badania genetyczne są także nieodzownym składnikiem współczesnych strategii profilaktyki nowotworów.

NAJWIĘKSZE SZANSE PRZEŻYCIA

W odróżnieniu od badań nad nowymi sposobami leczenia, badania dotyczące metod zapobiegania nowotworom nigdy nie cieszyły się zbytnim zainteresowaniem potencjalnych sponsorów. Profilaktyka nie jest tak *sexy* jak leczenie i nie zapewnia tak dużych korzyści koncernom farmaceutycznym. A poza tym, to oczywiste, że większe zaciekawienie budzą opowieści o wyleczonych nowotworach niż o nowotworach, które się nigdy nie pojawiły.

Jednak Berta Vogelsteina to nie zniechęca. „Jesteśmy przekonani, że przez następne 50 lat największe znaczenie

w walce z rakiem będą miały nie nowe metody leczenia zaawansowanych nowotworów, ale strategie zapobiegania im, a szczególnie sposoby wykrywania guzów w bardzo wczesnym stadium. Praktycznie wszystkie nowotwory można wyleczyć chirurgicznie, bez potrzeby dodatkowych naświetlań czy chemioterapii, jeśli tylko wykryjemy je odpowiednio wcześnie. Na pewno jest tak w przypadku raka jelita grubego, ale dotyczy to także wielu innych. To podstawowa zasada" – mówi.

Już od wielu lat laboratorium Vogelsteina w szpitalu Johnsa Hopkinsa bierze udział w tworzeniu narzędzi umożliwiających wczesne wykrywanie nowotworów. Naukowcy koncentrują swoje wysiłki na biomarkerach – wyrzucanych przez komórki rakowe fragmentach zmutowanego DNA, które mogą krążyć w morzu zdrowych cząsteczek DNA we krwi, moczu, kale lub ślinie pacjenta, nosząc w sobie ślady obecności utajonej choroby. „Najlepszym markerem, najlepszym genem jest oczywiście p53, ponieważ mutuje on w większej liczbie nowotworów niż jakikolwiek inny gen. To on jest podstawą tych badań" – wyjaśnia Vogelstein.

Płyn ustrojowy, w którym znajdujemy biomarkery, wskazuje zwykle lokalizację rozwijającego się nowotworu. Na przykład mocz sugeruje, że jest to pęcherz, kał, że to jelito grube, a ślina, że to płuca. Do końca 2012 roku członkowie zespołu Vogelsteina zbadali ponad 700 przypadków różnego rodzaju nowotworów, zaczynając od tych najbardziej zaawansowanych, by sprawdzić, czy możliwe jest wykrycie biomarkerów w organizmie. „Ponad 90 proc. nowotworów w zaawansowanym stadium – piersi, jelita grubego, trzustki i płuc – daje się wykryć w badaniu krwi" – podsumowuje Vogelstein. W przypadku zaawansowanego raka jelita grubego wykrywalność na podstawie badań kału wynosi

niemal 100 proc., ale nawet w stosunkowo wczesnym stadium, przed pojawieniem się przerzutów, sięga 85–90 procent. „Skuteczność tych badań zaczyna być porównywalna z kolonoskopią" – twierdzi Vogelstein. I dodaje, że w przypadku badań próbek krwi, jego zespół ma 50 proc. szans na wykrycie raka jelita grubego, zanim nowotwór się rozprzestrzeni. „Gdybyśmy mogli wykryć 50 proc. nowotworów będących w stadium, w którym są w pełni uleczalne, to byłoby fantastyczne osiągnięcie".

Naukowcy zajmujący się problemem nowotworów wątroby w Afryce Zachodniej odkryli biomarkery, które umożliwiają przeprowadzenie badań kontrolnych jeszcze przed wystąpieniem pierwszych objawów. W tym regionie, jak zapewne pamiętacie, rak wątroby powiązany jest z zanieczyszczeniem ziaren aflatoksyną, a cząsteczki DNA uwolnione do krwi z wątroby noszą na sobie charakterystyczne ślady mutacji genu p53. Również w innych miejscach na świecie naukowcy badają możliwości wykorzystania śladów zmutowanego p53 w płynach ustrojowych jako narzędzia umożliwiającego wczesne wykrycie nowotworu.

* * *

Tego typu badania kontrolne wymagają jeszcze dopracowania i weryfikacji, zanim staną się powszechne w warunkach klinicznych. Jednak większość naukowców zajmujących się na co dzień genem p53 jest przekonana, że wkraczamy w złoty wiek profilaktyki i leczenia nowotworów. Oto, czego możemy się spodziewać w ciągu najbliższych kilku lat:

Terapie genowe staną się rutynową metodą leczenia nowotworów, kiedy tylko naukowcy dopracują metody

modyfikowania wirusów wykorzystywanych jako nośniki genów (metody te zastosowano już skutecznie w leczeniu wielu osób cierpiących na rozmaite zaburzenia genetyczne).

Badania genetyczne nowotworów staną się powszechnym elementem diagnostyki, a status genu p53 będzie czynnikiem decydującym o wyborze najlepszej metody leczenia, także umożliwiającym skuteczne prognozowanie wyników.

Radykalne ograniczenie niepożądanych skutków ubocznych terapii nowotworowych będzie możliwe dzięki zastosowaniu precyzyjnie dobranych leków atakujących tylko komórki rakowe oraz wykorzystaniu strategii ochronnych, takich jak cykloterapia.

Pojawią się rozmaite leki oparte na [działaniu] p53, przeznaczone do wykorzystania w różnych sytuacjach, które będą mogły sterować działaniami supresorów nowotworowych.

„Jestem naprawdę wielkim optymistą" – mówi Gerard Evan. „Sądzę, że w ciągu najbliższych 15–20 lat nastąpi przełom w leczeniu i możliwościach eliminowania nowotworów u ludzi". I dodaje prowokacyjnie: „Moja córka ma dwadzieścia dwa, a syn dwadzieścia jeden lat. Mogę z pełnym przekonaniem powiedzieć, że oni nigdy nie będą musieli się obawiać, że umrą na raka".

O autorce

Sue Armstrong – dziennikarka radiowa i pisarka specjalizująca się w tematyce zdrowotnej i problematyce krajów rozwijających się. Była korespondentka radiowa BBC World Service w Brukseli i Republice Południowej Afryki. Ma na swoim koncie wiele audycji i publikacji, także w prestiżowym magazynie „Science". Pracowała jako konsultant dla Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) oraz dla Wspólnego Programu Narodów Zjednoczonych Zwalczania HIV i AIDS (UNAIDS). Z dotkniętych epidemią rejonów Afryki, Azji i Karaibów przez lata nadawała korespondencje o AIDS.

Obecnie mieszka w Edynburgu w Szkocji. Przygotowuje audycje naukowe dla BBC Radio 4 oraz BBC World Service.

W 2010 roku opublikowała swoją pierwszą książkę *A Matter of Life and Death: inside the hidden world of the pathologist*. Książkę *Białko p53. Gen, który złamał kod raka* wydała w roku 2014.

Na Twitterze ćwierka jako @armstrong_sue

Najważniejsze postaci

Uwaga: Poniższe krótkie noty biograficzne nie uwzględniają wszystkich osób wspomnianych w niniejszej książce. Ich celem jest przypomnienie najważniejszych postaci, których nazwiska pojawiają się najczęściej. Niektóre z nich nie zostały wcześniej przedstawione.

EVAN, GERARD

Naukowiec współpracujący z Cancer Research UK, obecnie zatrudniony na stanowisku profesora biochemii na Uniwersytecie Cambridge. Od początku entuzjastycznie nastawiony do pomysłu wykorzystania w badaniach myszy jako modelu funkcjonowania żywych organizmów. Znany jest z oryginalnych koncepcji, często podważających obowiązujące teorie i poglądy. Poznajemy go w Rozdziale 1, kiedy wypowiada prowokacyjne uwagi na temat rzadkiego występowania nowotworów.

HAINAUT, PIERRE

Od wielu lat pracuje dla działającej przy Światowej Organizacji Zdrowia Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem z siedzibą Lyonie, gdzie prowadzi bazę danych mutacji p53 – szczegółowy rejestr wszystkich mutacji genu opisanych w literaturze, obejmujący ich najważniejsze cechy charakterystyczne. Detektyw

z zamiłowania, szczególnie zainteresowany sposobami rozprzestrzeniania się i wzorcami choroby wywołanej przez zmutowane wersje p53 na całym świecie.

HALL, PETER

Profesor w katedrze patologii Uniwersytetu Dundee w Szkocji i bliski przyjaciel jednego z odkrywców genu p53, Davida Lane'a, z lat 90. ubiegłego wieku. P53 zawsze stanowił jeden z najważniejszych obszarów zainteresowań Halla. Najbardziej znany z oryginalnego eksperymentu, który wymyślili w pubie z Lane'em, by przetestować wpływ naświetlania na żywe organizmy.

KNUDSON, ALFRED

Amerykański genetyk nowotworów. Jako pierwszy zasugerował istnienie w naszych komórkach genów, których rolą jest ochrona przed rakiem. Hipoteza „dwóch uderzeń", ogłoszona przez Knudsona w 1971 roku, sformułowana na podstawie obserwacji zgromadzonych podczas badania przypadków siatkówczaka u dzieci, na zawsze zmieniła poglądy naukowców na temat procesu powstawania nowotworów.

LANE, DAVID

Kluczowa postać w historii genu p53. Jeden z czwórki naukowców, którzy, całkowicie niezależnie od siebie, odkryli gen w 1979 roku. Lane pracował wówczas w ICRF (Imperial Cancer Research Fund, znanym obecnie jako Cancer Research UK).

W latach 90. ubiegłego wieku na uniwersytecie w Dundee stworzył jedną z największych na świecie grup badawczych zajmujących się p53. On również jako pierwszy nazwał gen p53 „strażnikiem genomu".

LEVINE, ARNIE

Badacz z Uniwersytetu Princeton, w 1979 roku jeden z czterech niezależnych odkrywców genu p53 obok Lane'a i dwóch innych badaczy. Od tego czasu laboratorium Levine'a jest jednym z najważniejszych centrów badających p53. Miało swój udział w wielu najistotniejszych odkryciach związanych z funkcjonowaniem genu.

OREN, MOSHE

W 1984 roku jako jeden z pierwszych stworzył klon – idealną replikę – genu p53, z którego można było później produkować niezliczone jego kopie dla celów badawczych. Inne ważne dokonania Orena to odkrycie roli p53 w wywoływaniu procesu apoptozy (kontrolowanego samobójstwa komórek), a także wykrycie – wspólnie z Arnie'em Levinem i Carol Prives – mechanizmu kontrolującego działanie genu p53 w komórkach.

PRIVES, CAROL

Badaczka z Uniwersytetu Columbia [w Nowym Jorku], która, współpracując z Bertem Vogelsteinem, odkryła, że gen p53 działa w ludzkich komórkach jak główny przełącznik, który aktywuje i dezaktywuje inne geny w reakcji na odpowiednie sygnały.

Wspólnie z Moshe Orenem i Arnie'em Levine'em prowadziła również badania, które doprowadziły do ujawnienia mechanizmu kontrolującego działanie genu p53 w komórkach. Jedna z najważniejszych postaci w środowisku badaczy zajmujących się genem p53.

ROTTER, VARDA

Pracująca w Instytucie Naukowym Weizmanna w Izraelu Rotter była jedną z pierwszych osób, które dostrzegły, że gen p53 ulegając mutacji nie tylko traci swoje cechy supresora nowotworowego, ale tak naprawdę zaczyna działać jako czynnik wspierający rozwój nowotworu. Rotter znana jest z tego, że broniła swojego poglądu nawet wówczas, kiedy podważały go największe autorytety. Ostatecznie to właśnie jej naukowcy przyznali rację.

VOGELSTEIN, BERT

Po studiach medycznych i doświadczeniach pracy lekarza opiekującego się dziećmi chorymi na raka w szpitalu Johnsa Hopkinsa w Baltimore, Vogelstein rozpoczął karierę naukową w dziedzinie biologii molekularnej. Jako pierwszy badał działanie p53 w ludzkich nowotworach. Uczestniczył w wielu kluczowych odkryciach związanych z funkcjonowaniem genu, w tym z jego rolą supresora nowotworów i głównego przełącznika aktywującego inne geny w komórce.

WEINBERG, ROBERT

Wybitny amerykański naukowiec, od samego początku rewolucji w biologii molekularnej zaangażowany w odkrywanie genetycznych podstaw nowotworów. Najbardziej znany z odkrycia pierwszego onkogenu (genu promującego rozwój nowotworów) i pierwszego supresora nowotworów. Przez większość czasu pracował w Massachusetts Intitute of Technology (MIT). Wraz z Dougiem Hanahanem jest autorem doniosłej publikacji zatytułowanej „Cechy wyróżniające nowotwory", opisującej najważniejsze cechy charakterystyczne komórek rakowych.

WYLLIE, ANDREW

Wyllie, absolwent medycyny, przygotowywał właśnie pracę doktorską na Uniwersytecie Aberdeen w Szkocji, gdy zjawisko programowanej śmierci komórek, czyli samobójstwa komórek, zwane apoptozą, znalazło się w centrum zainteresowania biologów. Wyllie był w jednym z dwóch zespołów naukowców, które w tym samym czasie odkryły, że gen p53 może indukować apoptozę w reakcji na sygnał o zagrożeniu nie tylko w kulturach laboratoryjnych, ale także w warunkach naturalnych.

Uwagi dotyczące źródeł

Oprócz przeprowadzenia spotkań i rozmów z najważniejszymi postaciami w historii genu p53, przygotowując się do napisania tej publikacji, przetrząsnęłam również skarbnicę informacji na ten temat – w postaci książek, pism naukowych oraz stron internetowych. Często, opisując poszczególne kwestie, wykorzystywałam różne źródła. Poniżej przedstawiam listę tych, które okazały się szczególnie przydatne w kolejnych rozdziałach. Jest również kilka pozycji, z których zaczerpnęłam informacje, opinie oraz koncepcje istotne dla całej książki. Od nich chciałbym zacząć.

ainaut Pierre, Wiman Klas (red.), *25 Years of p53 Research*, Springer, Dordrecht 2005.

ıdson Horace Freeland, *The Eighth Day of Creation: Makers of the Revolution in Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury 1996.

ane David, Levine Arnold, „Research: The Past Thirty Years and the Next Thirty Years", „Cold Spring Harbor Perspectives in Biology" maj 2010, s. 53. To jeden z wielu znakomitych artykułów, jakie znalazłam w wydanej przez Cold Spring Harbor serii zatytułowanej „Perspectives in Biology", która jest dostępna na cshperspectives.cshlp.org/cgi/collection/ (patrz: The p53 Family).

Mukherjee Siddhartha, *Cesarz wszech chorób. Biografia raka*, Wydawnictwo Czarne, Wołowiec 2013.
Harmus Harold, *The Art and Politics of Science*, W.W. Norton & Co., Nowy Jork 2009.
„A Conversation with Robert Weinberg" (z serii „Conversations with Scientists" sponsorowanej przez MIT Department of Biology oraz Howard Hughes Medical Institute). Dostępna na video.mit.edu/watch/a-conversation-with-robert-weinberg-4508.
„Milestones in Cancer", seria artykułów naukowych udostępniona przez magazyn „Nature", dostępna na: www.nature.com/milestones/milecancer/index.html.
Strona internetowa p53. Źródło informacji dla naukowców badających gen p53 i jego związki z nowotworami, stworzona przez Thierry'ego Soussiego w 1994 roku, dostępne na http://p53.free.fr/.

Przedmowa

Motto – wypowiedź Gerarda Evana pochodzi z naszej rozmowy, która odbyła się w Cambridge w czerwcu 2012 roku.

Rozdział 1 – Ciało z naszego własnego ciała

Motto pochodzi z wykładu zatytułowanego „The Challenge to Man of the Neoplastic Cell", wygłoszonego przez Peytona Rousa przed Komitetem Noblowskim z okazji odebrania Nagrody Nobla, dostępnego na www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1966/rous-lecture.html

Oprócz nagranej w MIT i cytowanej wcześniej rozmowy, Robert Weinberg przedstawiał swoją pracę z Dougiem Hanahanem podczas konferencji w Narodowym Instytucie ds.

Raka w 2010 roku. Wykład dostępny na: www.youtube.com/watch?v=RP4js-yYK2U

Rozdział 2 – Wewnętrzny wróg

Motto jest cytatem z książki Michaela Bishopa zatytułowanej *How to Win the Nobel Prize: An Unexpected Life in Science*, Harvard University Press 2003, s. 161.

Informacje na temat Peytona Rousa znalazłam w znakomitym archiwum Fundacji Nobla, patrz: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1966/rous-bio.html

Oprócz wspomnianej wyżej książki autobiograficznej, bogatym źródłem informacji na temat Varmusa i Bishopa, zdobywców nagrody z 1989 roku, jest archiwum Fundacji Nobla, patrz: www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1989

Więcej informacji na temat debaty w Asilomar można znaleźć w: Peterson M.J., *Asilomar Conference on Laboratory Precautions. International Dimensions of Ethics Education in Science and Technology*, 2010. Dostępne na www.umass.edu/sts/ethics

Rozdział 3 – Odkrycie

Motto pochodzi z wymienionej wyżej książki Judsona, *The Eighth Day of Creation*, s. 10. Przypis dolny za Jeffreyem Taubenbergerem, patrz: www.pathsoc.org/conversations

Rozdział 4 – Ukryte życie

Motto pochodzi z książki Billa Brysona *Krótka historia prawie wszystkiego*, Zysk i S-ka, Poznań 2006, s. 383.

Informacje do tego rozdziału zaczerpnęłam głównie z Narodowego Instytutu Badań nad Ludzkim Genomem,

będącego częścią Narodowych Instytutów Zdrowia. Dostępne na www.genome.gov.

Rozdział 6 – Przypadek pomylonej tożsamości

Motto pochodzi z wymienionej wyżej książki Judsona, *The Eighth Day of Creation*, s. 594.

Oprócz nagranej w MIT i cytowanej wcześniej rozmowy, Robert Weinberg opowiada o swoim odkryciu onkogenów w ludzkich nowotworach na http://www.bioinfo.org.cn/book/Great%20Experments/great25.htm

Dodatkowe informacje na temat odkrycia pierwszego ludzkiego onkogenu i współpracy onkogenów można znaleźć w „Nature Milestone 17" i „Nature Milestone 18", dostępnych na www.nature.com/milestones/milecancer/timeline.html

Rozdział 7 – Nowe spojrzenie na raka

Motto jest cytatem z książki dziewiętnastowiecznego francuskiego pisarza Juliusza Verne'a zatytułowanej *Podróż do wnętrza ziemi*.

Informacje na temat Henry'ego Harrisa znalazłam w bogatych archiwach Genetics and Medicine Historical Network założonej przez Uniwersytet Cardiff przy wsparciu Wellcome Trust. Patrz: http://www.genmedhist.info/interviews/. Patrz także: *How Tumour Suppressor Genes were Discovered* autorstwa Henry'ego Harrisa w: „Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology" (FASEB), nr 7, s. 978–79.

Najważniejsze źródła informacji na temat odkrycia pierwszego genu supresorowego to nagrana w MIT i wspomniana wcześniej rozmowa z Robertem Weinbergiem oraz publikacja *Natural*

Obsessions: striving to unlock the deepest secrets of the cancer cell autorstwa Natalie Angier (Houghton Mifflin, Boston 1999).

Rozdział 8 – p53 ujawnia prawdziwe oblicze

Motto jest cytatem z wypowiedzi Francisa Cricka, który wspólnie z Jamesem Watsonem odkrył podwójną helisę DNA. Pochodzi z książki *The Eighth Day of Creation*, s. 93.

Suzy Baker opowiada swoją historię w „Redefining p53: Entering the Tumor Suppressor Era" opublikowanym w „Cell Cycle", 2003, nr 2, s. 7–8.

Rozdział 9 – Główny przełącznik

Motto jest cytatem z książki Matta Ridleya *Genome: the autobiography of a species in 23 chapters*, s. 271. Przedruk za zgodą HarperCollins Publishers Ltd © 1999 Matt Ridley.

Oprócz informacji zgromadzonych podczas spotkań i rozmów, przygotowując ten rozdział korzystałam z książki *25 Years of p53 Research*, wymienionej na początku tej listy.

Rozdział 10 – „Strażnik genomu"

Motto jest cytatem zaczerpniętym z komentarza Davida Lane'a zatytułowanego „Worrying about p53", zamieszczonego w „Current Biology", 1992, nr 2, s. 581–583.

Rozdział 11 – Jesienne liście i śmierć komórki

Motto pochodzi z książki *The Man Without Qualities*, autorstwa austriackiego pisarza Roberta Musila, niedokończonej w dniu jego śmierci w 1942 roku, wydanej pośmiertnie (Pan Macmillan, Londyn 1997)

Najważniejszym źródłem był artykuł Johna Kerra, „History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept"

opublikowany w „Toxicology", numery 181–182 (2002), s. 471–474.

Wywiad z Richardem Lockshinem: „Early work on apoptosis, an interview with Richard Lockshin" opublikowany w „Cell Death and Differentiation" 2008, nr 15, s. 1091–95.

Rozdział 12 – Myszy i ludzie

Motto pochodzi z książki *The Eighth Day of Creation*, s. 73.

Kluczowym źródłem informacji do tego rozdziału było archiwum Fundacji Nobla, która w 2007 przyznała Nagrodę w dziedzinie medycyny Mario Capecchiemu, Oliverowi Smithiesowi oraz Martinowi Evansowi za stworzenie transgenicznych myszy. Patrz na www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2007/

Innym ważnym źródłem informacji był Narodowy Instytut Badań nad Ludzkim Genomem. Patrz: www.genome.gov/10005834

Rozdział 13 – Czynniki hamujące podział komórki

Motto – wypowiedź Gerarda Evana pochodzi z naszej rozmowy, która odbyła się w Cambridge w czerwcu 2012 roku.

Oprócz informacji zgromadzonych podczas spotkań i rozmów, przygotowując ten rozdział korzystałam z książki *25 Years of p53 Research*, wymienionej na początku tej listy. Patrz zwłaszcza: Rozdział 4: *Gatekeepers of the Guardian: p53 regulation by post-translational modification, MDM2 and MDMX* autorstwa Geoffreya Wahla, Jayne Stommela, Kurta Krummela i Marka Wade'a.

Rozdział 14 – Dymiąca strzelba

Motto jest cytatem z książki Siddharthy Mukherjee zatytułowanej *Cesarz wszech chorób. Biografia raka*,

Wydawnictwo Czarne, Wołowiec 2013.

Informacje na temat Richarda Dolla i jego badań zaczerpnęłam z dwóch głównych źródeł: „Life of A Revolutionary", recenzji Jonathana Wooda do biografii Dolla pióra Conrada Keatinga, która 11 listopada 2009 roku pojawiła się na Oxford Science Blog publikowanym przez Uniwersytet w Oxfordzie, dostępnej na www.ox.ac.uk/media/science_blog/091111.html oraz z artykułu zamieszczonego w „British Medical Journal" z 30 września 1950 roku zatytułowanego „Smoking and carcinoma of the lung: preliminary report" autorstwa Richarda Dolla i A. Bradforda Hilla.

Informacje na temat Angela Roffo pochodzą z artykułu Roberta Proctora „Angel H Roffo: the forgotten father of experimental tobacco carcinogenesis" opublikowanego w „Bulletin of the World Health Organization" 2006, nr 84, s. 494–96.

Bogatym źródłem informacji do tego rozdziału były dokumenty opublikowane przez koncerny tytoniowe na mocy ugody z władzami Stanów Zjednoczonych, dostępne *online* na stronie: tobaccodocuments.org. Patrz zwłaszcza: tobaccodocuments.org/profiles/roffo_ah.html oraz tobaccodocuments.org/atc/60359252.html#images

Legacy Tobacco Documents Library stworzona i prowadzona przez Uniwersytet Kalifornijski w San Francisco także posiada ponad 14 milionów dokumentów dostępnych do wglądu na stronie http://legacy.library.ucsf.edu/.

Innym ważnym źródłem informacji był artykuł autorstwa Asafa Bittona i jego współpracowników (m.in. Stantona Glanza), zatytułowany „The p53 tumour suppressor gene and the tobacco industry: research, debate and conflict of interest" opublikowany w numerze pisma „Lancet" ze stycznia 2005 roku (s. 531–540).

Patrz także: rozmowa z Glanzem we „Frontline": „Inside the Tobacco Deal". *l*Dostępna na www.pbs.org/wgbh/pages/frontline/shows/settlement/interviews/glantz.html. Copyright © 1995–2014 WGBH Education Foundation. Patrz także: Stanton A. Glantz (red.), *The Cigarette Papers*, University of California Press, 1998.

Baza danych na temat genu p53 dostępna na: http://p53.iarc.fr

Rozdział 15 – Tropiąc odciski palców

Cytat z wypowiedzi Isaaca Asimova, biochemika i pisarza *science-fiction*, wykorzystany jako motto do tego rozdziału jest nieznanego pochodzenia, ale jest często przytaczany.

Przygotowując ten rozdział, opierałam się głównie na dwóch źródłach: artykule „A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma" autorstwa Douglasa E. Brasha i in. opublikowanym w „PNAS" w listopadzie 1991 roku, nr 88, s. 10124–28, oraz artykule „Sunlight and Skin Cancer" autorstwa Davida J. Leffella i Douglasa E. Brasha opublikowanym w „Scientific American", nr 275, s. 52–59, przedruk za zgodą ©1996 Scientific American, inc. Wszelkie prawa zastrzeżone.

Rozdział 16 – Rak w rodzinie

Motto – wypowiedź Patricii Prolli pochodzi z naszej rozmowy, która odbyła się w Porto Alegre [Południowa Brazylia] w 2012 roku.

Rozdział 17 – Wątek handlarzy tropeiro

Motto to cytat z Marii Skłodowskiej-Curie, fizyczki polskiego pochodzenia, znanej z pionierskich na początku XX wieku badań nad radioaktywnością.

Rozdział 18 – Doktor Jekyll i pan Hyde

Motto jest cytatem z wypowiedzi Jamesa Watsona, amerykańskiego biologa molekularnego, odkrywcy – wspólnie z Francisem Crickiem – podwójnej helisy DNA. Pochodzi z książki *The Eighth Day of Creation*, s. 27.

Ważnym dokumentem źródłowym wykorzystanym w tym rozdziale był artykuł „Mutant p53 Gain- of-Function in Cancer" autorstwa Moshe Orena i Vardy Rotter opublikowany w „Cold Spring Harbor Perspectives in Biology" 2010, nr 2, a001107. Tekst dostępny na: cshperspectives.com/content/2/2/a001107.full.

Informacje na temat Stanleya Prusinera znalazłam w archiwum Fundacji Nobla, która przyznała mu w 1997 roku Nagrodę w dziedzinie medycyny. Patrz: www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1997.

Inne ważne źródła informacji to dwa artykuły opublikowane równocześnie w 2004 roku w magazynie „Cell", nr 119, przez Tylera Jacksa i Gigi Lozano oraz ich współpracowników. Pierwszy, zatytułowany „Mutant p53 Gain of Function in Two Mouse Models of Li-Fraumeni Syndrome" autorstwa Kennetha P. Olive'a i in. (s. 847–860) i drugi, „Gain of Function of a p53 Hot Spot Mutation in a Mouse Model of Li-Fraumeni Syndrome" autorstwa Gene'a A. Langa i in. (s. 861–872).

Patrz także: „Mutant p53: one name, many proteins" autorstwa Williama A. Freeda-Pastora i Carol Prives w „Genes and Development" 2012, nr 26, s. 1268–86.

Rozdział 19 – Nowotwory i starzenie się – próba sił?

Motto pochodzi ze wstępu Johna Maddoxa, emerytowanego wydawcy „Nature", do książki *The Eighth Day of Creation* autorstwa Horace'a Freelanda Judsona, s. xii.

Kluczowe źródła wykorzystane w tym rozdziale to: artykuł „Using Mice to Examine p53 Function in Cancer, Aging, and Longevity" autorstwa Lawrence'a A. Donehowera opublikowany w „Cold Spring Harbor Perspectives in Biology" 2009, 1: a001081, patrz: http://cshperspectives.cshlp.org, artykuł „Two faces of p53: aging and tumour suppression" autorstwa Francisa Rodiera i in. opublikowany w „Nucleic Acids Research" 2007 nr 35 s. 7475–84, oraz „Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53" autorstwa Bernharda Maiera i in. opublikowany w „Genes and Development" 2004, nr 18, s. 306–19.

Nagranie wideo dra Briana Kennedy'ego, prezesa Buck Institute for Research on Aging w Novato w Kalifornii, w rozmowie z Judith Campisi, 5 lutego 2013, dostępne na: http://vimeo.com/58981629.

Rozdział 20 – Rewolucja w leczeniu

Motto pochodzi z artykułu Sharon Begley „The Cancer Killer" zamieszczonego w tygodniku „Newsweek" 13 stycznia 1997.

W rozdziale wykorzystałam informacje zaczerpnięte z książki zatytułowanej *P53 in the clinic* wydanej przez Pierre'a Hainauta, Magali Olivier oraz Klasa Wimana (Springer, Dordrecht 2013).

Inne ważne źródła:

p53-based Cancer Therapy" autorstwa Davida P. Lane'a, Chit Fang Cheok i Sonii Lain w „Cold Spring Harbor Perspectives in Biology" 2010, 2: a001222. Patrz: http://cshperspectives.cshlp.org.

Cancer Specific Viruses and the Development of ONYX-015" autorstwa Franka McCormicka w „Cancer Biology & Therapy 2" 2003, Suppl. 1, s. 157–160.

Clinical Trials with Oncolytic Adenovirus in China" autorstwa Wanga Yu i Hu Fanga w „Current Cancer Drug Targets" 2007, nr 7,

s. 659–670.

MDM2 antagonist Nutlin-3a potentiates antitumour activity of cytotoxic drugs in sarcoma cell lines", autorstwa Hege O. Ohnstada i in., w „BMC Cancer" 2011 nr 11, s. 211.

An evaluation of small-molecule p53 activators as chemoprotectants ameliorating adverse effects of nticancer drugs in normal cells" autorstwa Ingeborg M.M. van Leeuwen i in. w „Cell Cycle" 2012 nr 11, s. 1851–61.

Cyclotherapy: opening a therapeutic window in cancer treatment" autorstwa Ingeborg M.M. van Leeuwen w „Oncotarget" 2012, nr 3, s. 596–600.

Wykład Gerarda Evana zatytułowany „Cancer isn't mysterious" wygłoszony dla pracowników Cancer Research UK we wrześniu 2012 roku. Dostępny na: http://www.frequency.com/video/cruk-passion-ta/59881838.

Podziękowania

Prace nad niniejszą książką mogłyby nigdy nie ruszyć z miejsca, gdyby nie gotowość Pathological Society of Great Britain and Ireland do wspierania idei szerokiego promowania nawet najbardziej ścisłych nauk. Jestem niezmiernie wdzięczna za ich wkład finansowy w moje badania i za entuzjazm okazany temu projektowi przez radę Towarzystwa. W szczególności chciałabym podziękować Peterowi Hallowi, który jako pierwszy zasugerował, że powinnam napisać książkę, a później poświęcił mi kilka dni w swoim gabinecie na Uniwersytecie Królowej w Belfaście, gdzie wspólnie przygotowywaliśmy zarys historii p53. Dziękuję również Alastairowi Burtowi i Simonowi Herringtonowi, którzy wspierali mój pomysł w komisji Path Soc.

Chciałabym również przekazać najszczersze wyraz wdzięczności następującym osobom i instytucjom: Annie Day z Uniwersytetu Dundee za pomoc w realizacji projektu, Society of Authors za stypendium na badania, które pozwoliło mi na podróże, mojemu agentowi Donaldowi Winchesterowi z Watson Little Ltd. za ciche wsparcie, trafne obserwacje i zawsze dobre rady, Jimowi Martinowi z Bloomsbury Sigma za jego entuzjazm i zaangażowanie, mojej redaktorce Caroline Taggert za dobre oko i cenne wskazówki, Suzanne Cherney, jednej z najlepszych redaktorek pracujących dla Światowej Organizacji Zdrowia, za uważną lekturę maszynopisu i celne komentarze (a także za długą przyjaźń i wiele radości), mojej przyjaciółce, pisarce

Claire Bell za jej wsparcie w czasie pisania i mądre opinie w krytycznych momentach, moim tłumaczom w Brazylii, Fernandzie Paschoal Fortes (która nauczyła mnie też pić caipirinhę!) i Henrique Camposowi Galvao, a wreszcie także Elisabeth Garret za gościnność, którą okazała mi podczas mojego pobytu w Cliff Cottage, azylu dla pisarzy na poszarpanym wybrzeżu hrabstwa Aberdeen. Specjalne podziękowania należą się mojemu partnerowi Fredowi Briglandowi za jego nieustające wsparcie, gotowość słuchania i zrozumienie mojej pasji.

Jestem niezmiernie wdzięczna również wszystkim naukowcom, którzy poświęcili mi swój czas, podzielili się ze mną doświadczeniami i opowiedzieli o wzlotach i upadkach, jakich doświadczali w czasie swoich badań. Spośród nich chciałabym wspomnieć przede wszystkim Pierre'a Hainauta, którego rady, wskazówki i ciągła gotowość do odpowiedzi na kolejne pytania umożliwiły mi kontynuację i zakończenie pracy. Swoją wiedzę na temat p53 i zrozumienie mechanizmów działania genu zawdzięczam spotkaniom i rozmowom z wieloma ludźmi, których nazwiska nie pojawiają się na kartach książki, ale bez pomocy których nigdy by ona nie powstała. Są to Walter Bodmer, Jean-Christophe Boudron, Xin Lu, David Meek, Thea Tlsty, Karen Voudsen i Geoff Wahl. Dziękuję również Suzy Baker, Billowi Brysonowi, Judith Campisi, Richardowi Lockshinowi, Mattowi Ridleyowi oraz Bobowi Weinbergowi za zgodę na wykorzystanie krótkich wypowiedzi pochodzących z innych źródeł.

Chciałabym też szczególnie podziękować Luanie Locke, Johnowi Berkeleyowi oraz członkom brazylijskich rodzin dotkniętych zespołem Li-Fraumeni za ich wzruszające opowieści o życiu w cieniu raka. Właśnie takie historię przenoszą naszą uwagę ze sztucznych warunków laboratorium na prawdziwe życie

i rzeczywiste tragedie. Pokazują nam również, że badania nad genem p53 mają realne znaczenie dla nas wszystkich.

Sue Armstrong, sierpień 2014

Przypisy

[1] Janna J. Levin – urodzona w 1967 roku amerykańska kosmolog. Od 2004 roku pracuje na Uniwersytecie Columbia w Nowym Jorku. Jest m.in. autorką głośnej książki *How the universe got its spots* – przyp. Kurhaus.

[2] Właściwie Francis Peyton Rous (1879–1970) – amerykański naukowiec, lekarz, laureat Nagrody Nobla w 1966 roku (wspólnie z Charlesem Hugginsem). Dzięki jego badaniom nad rakotwórczą rolą niektórych wirusów odkryto pierwszego onkowirusa, czyli wirusa powodującego powstawanie guzów nowotworowych. Nazwano go, na cześć badacza, wirusem mięsaka Rousa – przyp. Kurhaus.

[3] Proliferacja oznacza dzielenie się komórek. Gdy proces podziałów komórkowych wymyka się organizmowi spod kontroli, wówczas rozwija się nowotwór – przyp. Kurhaus.

[4] Stworzona w 1996 roku bezpłatna wyszukiwarka artykułów z dziedziny medycyny i nauk biologicznych.

[5] Hanahan D., Weinberg R.A.: The hallmarks of cancer, „Cell" 2000, nr 1, s. 57–70 – przyp. Kurhaus.

[6] Właściwie John Michael Bishop (ur. 1936) – współczesny amerykański immunolog i mikrobiolog. W 1989 roku wraz z innym naukowcem, Haroldem Varmusem, otrzymał Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny za odkrycie retrowirusów onkogennych – przyp. Kurhaus.

[7] Dopiero kiedy w 1931 roku wynaleziono mikroskop elektronowy, po raz pierwszy można było ujrzeć cząsteczki wirusa.

[8] Horace Freeland Judson (1931–2011) – amerykański historyk biologii molekularnej, popularyzator nauki. Autor kilku doskonałych książek, m.in. *The Eight Day of Creation* – przyp. Kurhaus.

[9] Wirus zidentyfikowany jako 40 wirus znaleziony u małp – przyp. Kurhaus.

[10] Badaczowi chodzi prawdopodobnie o to, że promieniotwórczość tych izotopów, sygnalizowana przez urządzenie zwane licznikiem Geigera, odstrasza innych naukowców – przyp. Kurhaus.

[11] Penn Station – ważna stacja kolejowa Nowego Jorku położona pod ziemią, na wysokości środkowego Manhattanu. Stanowi węzeł łączący nowojorskie metro i kolej naziemną – przyp. Kurhaus.

[12] „Wirus to nic więcej, jak materiał genetyczny zawarty w jakimś białku, rozumiecie? Zatem, to, czy jest on żywy, czy nie, stanowi kwestię sporną. Jest on albo złożonym związkiem chemicznym albo bardzo prostą formą życia" – mówi Jeffrey Taubenberger, starszy badacz Laboratorium Chorób Zakaźnych należącego do Narodowego Instytutu ds. Alergii i Chorób Zakaźnych w Bethesdzie, w stanie Maryland.

[13] Autorka stosuje określenie *postdoc*, które wyjaśnione zostało w Słowniku – przyp. Kurhaus.

[14] Właściwie William McGuire Bryson (ur. 1951) – amerykański pisarz popularnonaukowy, mieszkający w Wielkiej Brytanii. Sławę przyniosły mu książki o podróżach. Napisał m.in. docenioną przez krytykę i środowiska naukowe książkę pt.

Krótka historia prawie wszystkiego (wyd. pol. 2009) – przyp. Kurhaus.

[15] Więcej na jej temat w Rozdziale 3 – przyp. Kurhaus.

[16] Dwa pozostałe zespoły stanowiły: grupa naukowców z amerykańskiego Narodowego Instytutu ds. Raka, której przewodził Mariano Barbacid oraz grupa Michaela Wiglera z Cold Spring Harbor.

[17] Juliusz Verne (1828–1905) – słynny francuski pisarz, autor m.in. *20000 mil podmorskiej żeglugi* – przyp. Kurhaus.

[18] Alfred Knudson zmarł w Filadelfii w 2016 roku, w wieku 94 lat – przyp. Kurhaus.

[19] Memorial Sloan Kettering Cancer Center to największy onkologiczny szpital w Nowym Jorku i jedno z najważniejszych centrów onkologii w USA – przyp. Kurhaus.

[20] Guz Wilmsa – złośliwy nowotwór nerki u dzieci. Nazwa pochodzi od niemieckiego chirurga Maksa Wilmsa, który jako pierwszy opisał chorobę – przyp. Kurhaus.

[21] Wojna koreańska toczyła się w latach 1950–1953 – przyp. Kurhaus.

[22] Mutacja genowa polegająca na utracie jednej lub większej liczby par nukleotydów z DNA nazywana jest w medycynie delecją – przyp. Kurhaus.

[23] Francis Harry Compton Crick (1916–2004) – angielski biochemik i genetyk uważany za odkrywcę struktury molekularnej DNA. W 1962 za swoją pracę badawczą otrzymał, wraz z dwoma innymi naukowcami, Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny – przyp. Kurhaus.

[24] Chodzi o zanieczyszczenie jednego materiału lub produktu innym materiałem lub produktem – przyp. Kurhaus.

[25] Mutacja somatyczna to mutacja w dojrzałej komórce, która pojawia się spontanicznie w trakcie jej życia. To przeciwieństwo mutacji dziedzicznej, która jest obecna we wszystkich komórkach, zarówno normalnych jak i nowotworowych.

[26] Matt Ridley (ur. 1958) – angielski pisarz popularnonaukowy, były redaktor naukowy tygodnika „The Economist" i przedsiębiorca. Był pierwszym przewodniczącycm Międzynarodowego Centrum Dla Życia (International Centre for Life) w Newcastle. Autor wielu książek. W Polsce wydano m.in. tytuły: *Czerwona królowa: Płeć a ewolucja ntury ludzkiej*, *O pochodzeniu cnoty*, *Genom. Autobiografia gatunku* – przyp. Kurhaus.

[27] Chodzi o *footprinting*, czyli metodę pozwalającą badać oddziaływania białek ze specyficznymi rejonami DNA. Polega ona na inkubacji białka ze znakowanym na końcu cząsteczki fragmentem kwasu nukleinowego, a następnie degradacji DNA w odpowiedni sposób – celem dowiedzenia się, z jaką sekwencją DNA oddziaływuje badane białko – przyp. Kurhaus.

[28] Chodzi o geny hamujące podział komórki i uczestniczące w naprawie DNA – przyp. Kurhaus.

[29] Robert Musil (1880–1942) – austriacki pisarz, znany przede wszystkim jako autor niedokończonej powieści *Człowiek bez właściwości* – przyp. Kurhaus.

[30] Tak naprawdę pierwsza transgeniczna mysz powstała w 1982 roku za sprawą Richarda Palmitera z Uniwersytetu Waszyngtońskiego i Ralpha Brinstera z Uniwersytetu Pensylwanii. Proces modyfikacji genetycznej stał się jednak znacznie prostszy i bardziej precyzyjny dzięki technologii, której opracowanie przyniosło Capecchiemu i Smithiesowi Nagrodę Nobla.

[31] Lipoproteina stanowi połączenie cząsteczki tłuszczu i białka. Białko pomaga transportować tłuszcz do tych miejsc w organizmie, w których jest on potrzebny.

[32] Siddartha Mukherjee – amerykański onkolog pochodzenia hinduskiego. Autor książki *Cesarz wszech chorób. Biografia raka* – przyp. Kurhaus.

[33] *Brown ale* to gatunek piwa produkowanego w Wielkiej Brytanii i Stanach Zjednoczonych. Historycznie warzono je z ciemnego słodu – przyp. Kurhaus.

[34] Isaac Asimov (1920–1992) – amerykański biochemik i pisarz *science-fiction* rosyjskiego pochodzenia. Autor powieści i opowiadań, takich jak *Nemesis* czy *Ja, robot* – przyp. Kurhaus.

[35] Odsetki składane to takie, które sprawiają, że kapitał podlegający oprocentowaniu w kolejnych okresach odsetkowych coraz bardziej rośnie. Są to odsetki obliczane w taki sposób, że po każdym okresie odsetkowym odsetki dopisywane są do kapitału – przyp. Kurhaus.

[36] Patricia Ashton-Prolla – brazylijska genetyk, szefowa centrum badań eksperymentalnych w Szpitalu Klinicznym w Porto Alegre – przyp. Kurhaus.

[37] Robert Warwick Miller zmarł w 2006 roku, w wieku 84 lat – przyp. Kurhaus.

[38] Więcej o nim w Rozdziale 7 – przyp. Kurhaus.

[39] Maria Skłodowska-Curie (1867–1934) – polska fizyk i chemiczka pracująca we Francji. Podwójna laureatka Nagrody Nobla: w dziedzinie fizyki w 1903 roku (wraz z Pierre'em Curie i Henrim Becquerelem – za badania nad promieniotwórczością) oraz chemii w 1911 roku (za odkrycie radu i polonu) – przyp. Kurhaus.

[40] John Maddox (1925–2009) – brytyjski biolog i popularyzator nauki. Przez 22 lata był redaktorem naczelnym prestiżowego magazynu „Nature” – przyp. Kurhaus.

[41] Łacińskie słowo *senesctus* oznacza „starość” – przyp. Kurhaus.

[42] Sharon Begley jest amerykańską dziennikarką popularnonaukową. Pisze dla portalu „Stat” należącego do grupy Boston Globe Media – przyp. Kurhaus.

[43] Leki sieroce to leki wykorzystywane w leczeniu rzadko występujących chorób – przyp. Kurhaus.

[44] Inhibitor to czynnik wywołujący spowolnienie danej reakcji chemicznej – przyp. Kurhaus.